

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2002-501184  
(P2002-501184A)

(43)公表日 平成14年1月15日(2002.1.15)

(51)IntCL <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/533		G 0 1 N 33/533	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21)出願番号 特願2000-528720(P2000-528720)  
(86)(22)出願日 平成11年1月22日(1999.1.22)  
(85)翻訳文提出日 平成12年7月24日(2000.7.24)  
(86)国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 0 1 3 1 5  
(87)国際公開番号 W O 9 9 / 3 7 8 1 4  
(87)国際公開日 平成11年7月29日(1999.7.29)  
(31)優先権主張番号 6 0 / 0 7 2 , 1 6 0  
(32)優先日 平成10年1月22日(1998.1.22)  
(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 ルミネックス コーポレイション  
アメリカ合衆国 78727-6115 テキサス  
州 オースティン, テクノロジー プール  
ヴァード 12212  
(72)発明者 チャンドラー, マーク ビイ.  
アメリカ合衆国 78700 テキサス州 オ  
ースティン, ナイルズ ロード 4  
(72)発明者 チャンドラー, ドン  
アメリカ合衆国 78731 テキサス州 オ  
ースティン, ヴァルバーン ドライヴ  
7300  
(74)代理人 弁理士 大竹 正悟

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多数の蛍光シグナルを有する微小粒子

(57)【要約】

本発明は、その表面に、異なる蛍光染料で染色された多数のより小さなポリマー粒子またはナノ粒子を担持するコア、あるいは担体粒子を含んでいる新規蛍光物品を提供する。光源により励起された時、これらは同時に多重の蛍光放射を発することができ、これは試料内の多数の分析物の多様な分析に有用である。この表面上に蛍光ナノ粒子を持つ連結複合粒子、このようなポリマー物品を製造する方法、およびこのような粒子を使用した様々な応用及び方法が特許請求される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 少なくとも1つの蛍光染料により標識された所定量のナノ粒子を結合して有している担体微小粒子を含んでなる物品。

【請求項2】 担体微小粒子またはナノ粒子、若しくは担体微小粒子とナノ粒子両方がポリマーを含んでなる請求項1の物品。

【請求項3】 前記担体微小粒子が約0.1  $\mu\text{m}$ ～約1,000  $\mu\text{m}$ の直径を有するポリマー粒子を含んでなる請求項1の物品。

【請求項4】 前記担体微小粒子が少なくとも1つの蛍光染料を含んでなる請求項1の物品。

【請求項5】 前記ナノ粒子が約1 nm～約100,000 nmの直径を有するポリマー粒子を含んでなる請求項1の物品。

【請求項6】 前記ポリマーが、0重量%～約50重量%の架橋剤を含んでなる請求項2の物品。

【請求項7】 前記ポリマーが磁石または磁気応答性の金属酸化物を含んでなる請求項2の物品。

【請求項8】 前記ポリマーがさらに官能基を含んでなる請求項2の物品。

【請求項9】 少なくとも1セットのポリマーナノ粒子であって、該1セットのポリマーナノ粒子は異なる蛍光シグナルを持っているポリマーナノ粒子を担体ポリマー微小粒子に結合させることを含んでなる蛍光物品を製造する方法。

【請求項10】 前記異なる蛍光シグナルが少なくとも1つの蛍光染料によって提供される請求項9の方法。

【請求項11】 前記蛍光染料が担体ポリマー微小粒子に組込まれる請求項10の方法。

【請求項12】 前記ナノ粒子が前記担体微小粒子に共有結合する請求項9の方法。

【請求項13】 前記ナノ粒子のセットが前記担体微小粒子に吸着によって結合される請求項9の方法。

【請求項14】 前記蛍光物品がポリマーシェルによって囲まれる請求項9の方法。

【請求項15】 試料内に少なくとも1つの分析物が存在するか又はしないかを決定する方法であって、

(a) 試料と、少なくとも1つの蛍光的に標識されたナノ粒子とそれぞれの分析物に結合するかそれと反応する少なくとも1つの分析反応物をその表面に配置している既知量の微小粒子とを混合して反応混合液を作製し、

(b) 分析物に反応したか結合した微小粒子を分析し、試料内に分析物が存在するかしないかを確定する、  
工程を含んでなる方法。

【請求項16】 前記混合工程(a)がさらに反応混合液中に所定量の競合分子を混合することを含んでなる請求項15の方法。

【請求項17】 前記分析工程(b)がフローサイトメトリーを用いて分析することを含んでなる請求項15の方法。

【請求項18】 前記分析物を既知量の基準物質と比較する工程(c)をさらに含んでなる請求項15の方法。

【請求項19】 分析物が抗原、抗体、レセプター、ハプテン、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸、薬剤、ホルモン、化学物質、ポリマー、病原体、毒素、およびそれらの組合せからなる群から選択される請求項15の方法。

【請求項20】 分析反応物が分析物の結合対を含んでなる請求項15の方法。

【請求項21】 競合分子がそれぞれの分析反応物と分析物との結合を妨げる分子を含んでなる請求項16の方法。

【請求項22】 基準物質がそれぞれの分析反応物との結合において分析物と本質的に同一である請求項18の方法。

【請求項23】 試料内の多数の分析物であり、それぞれの分析反応物によって認識される分析物を検出する方法であって、

a) 異なる蛍光シグナルと異なる分析反応物を有する蛍光物品の各集団であり、前記分析反応物は特異的に試料内の1つの分析物に結合し、各蛍光物品はそれぞれの蛍光染料で標識された少なくとも1つのナノ粒子を含んでなる、多数の蛍光物品の集団を、試料と接触させ、

b) 標識試薬へ試料を加え、

c) 分析反応物へ分析物が結合したことを示す、前記標識を検出するために前記物品を分析し、同時に

d) 前記各集団に関連した異なる蛍光シグナルの機能として、それぞれの分析物と結合する物品の集団を決定すること、  
を含んでなる方法。

【請求項24】 前記方法がフローサイトメトリーを含んでなる請求項23の方法。

【請求項25】 蛍光物品の前記集団がさらにそれらのサイズと形状によって決定される請求項23の方法。

【請求項26】 前記標識試薬が蛍光標識試薬を含んでなる請求項23の方法。

【請求項27】 対象とする多数の分析物の検出用に適したキットであって、

(a) 異なる蛍光シグナルを持つナノ粒子と結合している微小粒子の系統であり、前記系統の各構成物は対象の分析物の1つに特異的に結合することができる分析反応物を有する系統、

(b) 分析試薬と同一の分析物に結合する試薬を含んでなる第2試薬、

(c) 前記第2試薬上で、またはそれによって、または関連して提供される蛍光標識、

を含んでなり、前記キットが使用されるとき、分析反応物が特異的結合を介して対象の分析物と関連するようになり、第2試薬が特異的分析反応物への分析物の結合の機能として蛍光物品に関連することが可能になり、前記蛍光標識からのシグナルが微小粒子からの蛍光シグナルとは独立したシグナル検出方法によって検出可能であるキット。

【請求項28】 分析物と分析反応物との特異的結合相互作用を妨げることのできる競合分子をさらに含んでなる請求項27のキット。

【請求項29】 それぞれの分析反応物と結合する分析物と本質的に同一な基準物質をさらに含んでなる請求項27のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は参照として本明書に組み込まれた全開示である1998年1月22日に提出された米国仮出願番号第60/072,160号の優先日付の権利を請求するものである。

## 【0002】

## (発明の分野)

本発明は、一般的にフローサイトメトリーに関し、より詳細には1つ以上の蛍光染料で染色されたポリマーナノ粒子をその表面に担持する微小粒子に関する。

## 【0003】

## (発明の背景)

蛍光ポリマー粒子はしばしば様々な生物医学的アッセイにおいてマーカーおよびインジケーターとして利用されている。本明細書で以下使用しているところの微小粒子、ミクロスフェア、またはマイクロビーズという用語は互換的に使用され、全体の直径が基本的にマイクロメートルの範囲内である小さな粒子を示す同様の意味を持つ。ナノスフェア、ナノ粒子、ナノビーズは全体のサイズが基本的にナノメートルの範囲であるより小さな粒子を示す。本明細書で以下使用されているところの粒子、スフェア、ビーズの一般的な語は、微小粒子、ナノ粒子の両方を示し、これらは固体支持体または固相として効果的に役立つ。蛍光粒子は通常、最初にL. B. Bangs (均一なラッテックス粒子; Seragen Diagnostics Inc. 1984, p. 40) によって記載された技術に従って蛍光染料を埋め込むか拡散させることで入手される。当技術分野で知られている他の方法は、蛍光染料で粒子を染色する方法である。本明細書で以下使用されるところの蛍光染料、蛍光剤、蛍光色素(フルオロクローム)、発蛍光団(フルオロフォア)という用語は互換的に使用され、同等の意味を持つ。微小粒子はしたがって手動または当技術分野で知られている他の方法で分析することができるが、好ましくは例えばMansourらに付与された米国特許第4,665,024号に開示されたようなフローサイトメトリー等の自動化技術を用いて分析できる。

## 【0004】

これらの粒子の多様性はそれぞれが固有のスペクトル特性を持っているような多数の染料を単一の粒子内に結合させることで増加させることができる。当業者は単一の粒子上の染料の固有の組合せの順列数を増加させるために、割合を変化させた2つ以上の染料を使用できることを理解するであろう。1つの粒子内への単一の染料の単純な吸着がほとんどの目的にとって十分であると証明された一方、1つ以上の染料が粒子内に吸着されたときいくつかの問題が起こる。

## 【0005】

まず、埋め込まれた染料分子の近接が明白な量まで蛍光エネルギー転移を上昇させる。このエネルギー転移は、関与する染料濃度とそれらの本来の放射パターンと矛盾した蛍光放射を導く。

## 【0006】

もう一つの問題は、使用した染料基質が、粒子に染料を組み込むために使用した溶媒内で異なる溶解性を持つ場合に発生する。すべての染料は同時に吸収されなければならないので、可能な染料比は溶媒の特性に制限される。

## 【0007】

複数の染料を微小粒子に埋め込んだときに会第3の問題は、染料スペクトルの変化である。とりわけ粒子が架橋されたポリスチレンを含んでいる場合に、蛍光放射ピークの明らかな広がりが起こることが知られている。このことはかなりの染料のスペクトルとの重なりを生じる。

## 【0008】

これらの問題を回避する1つの方法は、それぞれの染料基質を粒子の表面に化学的に連結させることである。このアプローチは例えば、米国特許第5,194,300号、Cheung；米国特許第4,774,189号、Schwartzに開示されており、そこでは1つまたはいくつかの蛍光染料を粒子表面に共有結合させている。しかしながら、これは染料分子がその環境にさらけ出されたままであり、酸化または他の化学的攻撃による分解がはやめられる。さらに、多くの表面結合部位が染料によって占有され、アッセイを行うのに必要な分析反応分子の結合ができない可能性がある。

## 【0009】

したがって多色蛍光粒子を有することが望ましく、それによって上記の問題が回避される。本発明は、多数染料粒子の多様性を保持しながら、これらの好ましくない問題を最小化または排除する。

## 【0010】

したがって本発明は新規の物品を提供し、それはその表面に1つ以上の蛍光染色されたナノ粒子の集団またはセットが結合したポリマー微小粒子を含んでいる。与えられた集団でのすべてのナノ粒子は同濃度の染料で染められ、異なる染料で染色された他のナノスフェアの既知の量と共に、既知の数のこれらのナノスフェアをマイクロ粒子に結合することで多数の蛍光ミクロスフェアができる。ナノスフェアの異なる集団またはセットの、量と比を変化させることで、固有の放射スペクトル又は蛍光シグナルを持つ担体粒子の多量の目立たない集団を確定させ区別できる。

## 【0011】

Massonらは米国特許第4, 279, 617号で、単純な吸着で、または臭化シアンあるいはヒドロキシル化ラテックスと共有結合することのどちらかで、例えばアレルゲンのような分析反応物でコートした相対的に大きな直径（例えば $0.79\mu\text{m}$ ）のラテックス粒子を開示した。アレルギー反応を示していると予想される個体からのヒト血清試料をこれらの粒子の懸濁液と混合する。混合液をインキュベートし、そして相対的により小さな直径（例えば $0.08\mu\text{m}$ ）のラテックス粒子を加える。これらの小さな粒子はウサギ抗IgE抗体でコートされ、もし大きな粒子がIgEをアレルゲンに結合させた場合、これらの小さな粒子がこれらの抗体に結合し、凝集反応によって、凝集粒子と呼ばれる粒子を形成し、すなわち大きな粒子がいくつかの小さな粒子に取り囲まれる。しかしながらこれらの粒子は互いに非共有結合で結合し、凝集はその結果と、対象の分析物の存在の結果として起こる。対照的に本発明の物品は、それが対象の分析物の検出より前に形成されることを必要とする。

## 【0012】

本発明の物品がMassonらと他の先行技術開示者たちによって開示された

存在する凝集粒子に似ているように見るかもしれないが、方法と粒子間の結合の段階的な順番が根本的に似ていないことから、これらは特許的に本発明とは異なる。凝集アッセイの目的と検出の方法もまた根本的に異なる。したがって、粒子凝集方法と組成物に関連している先行技術開示は本発明に全体的に無関係であり、関連はない。

#### 【0013】

本明細書に引用されたいかなる参考文献も先行技術であるとは承認しない。すべての参考文献は参照によってここに組込まれる。

#### 【0014】

##### (発明の要約)

したがって、本発明の目的は、新規の物品を提供することであり、それはその表面に、1つ以上の蛍光で染色されたナノ粒子の集団を持つ微小粒子を含む。与えられた集団内のすべてのナノスフェアは同一の濃度の染料で染色され、異なる染料で染色された既知の量の他のナノスフェアと共に、微小粒子に既知の量のこれらのナノスフェアを結合することで多数の蛍光ミクロスフェアができる。異なる集団のナノスフェアの量と比を変えることで、固有の放射スペクトルを持つ担体粒子の目立たない集団の多くの量を確定させ区別できる。

#### 【0015】

本発明で担体あるいはコア粒子として使用したポリマー微小粒子は、1ミリメートル未満の直径であり、好ましくは直径で約0.1~1,000マイクロメートル( $\mu\text{m}$ )の範囲のサイズである。微小粒子は任意のサイズであって良いが、好ましいサイズは1~100 $\mu\text{m}$ であり、より好ましくは2~50 $\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは3~25 $\mu\text{m}$ であり、よりさらに好ましくは約6~12 $\mu\text{m}$ である。

#### 【0016】

ナノ粒子の好ましいサイズは、直径で約1ナノメートル( $\text{nm}$ )から約100,000 $\text{nm}$ の範囲である。最適な好ましい直径は約10と1,000 $\text{nm}$ の間であり、好ましくは100と800 $\text{nm}$ の間、さらに好ましくは200と500 $\text{nm}$ の間である。



## 【0017】

本発明のさらなる目的は、担体粒子と同様にナノスフェアを提供することであり、これらは好ましくはポリマー物質、すなわちポリスチレンからできている。しかしながら、ポリマー化物質は、臭素処理ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアクリルアミド、ポリアクロレイン、ポリブタジエン、ポリカプロラクトン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブレン、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピリジン、ポリビニルベンジルクロライド、ポリビニルトルエン、塩化ポリビニリデン、ポリビニルベンゼン、ポリメチルメタクリル酸、ポリラクチド、ポリグリコリド、ラクチド-グリコリド共重合体、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリホスファーゼ、ポリスルフォンを含み、またこれらの組合せも同様に許容可能であるがこれらに限定されない。例えばカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシルセルロースのような炭化水素、アガー、ゲル、タンパク質のポリマー、ポリペプチド、真核および原核細胞、ウイルス、脂質、金属、レジン、ラテックス、ゴム、例えばポリジメチルジフェニルシロキサンなどのシリコン、ガラス、セラミック、木炭、カオリナイト、ベントナイト等の他の同様な物質も同じように使用できる。

## 【0018】

これらのポリマーはまた磁石あるいは過常磁性、常磁性、または強磁性金属酸化物からなる群から選択した磁気応答性の金属酸化物を組み込んでも良い。

## 【0019】

ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリル酸、トリメチロールプロパントリメタクリル酸、N, N' メチレン-ビス-アクリルアミド、または当技術分野で知られている機能的に同等な試薬である、架橋剤を約0%~50%（重量/重量）含む粒子を提供することも本発明のさらなる目的である。好ましい実施形態においては、ナノスフェアと同様にコアミクロスフェアはポリスチレンからなり、約0%から30%のジビニルベンゼンを含む。

## 【0020】

カルボン酸、エステル、アルコール、カルバミド、アルデヒド、アミン、硫黄酸化物、窒素酸化物、ハロゲン化物等の付加的な表面官能基を含むであろう粒子を提供することも本発明のさらなる目的であり、これらは分析反応物の結合および／または粒子間結合を可能にしよう。

#### 【0021】

共有結合または例えば、イオン結合、水素結合などの任意の他の既知のカップリング方法によって、または単純吸着によって微小粒子を準備する方法を提供することも本発明のさらなる目的である。他の結合手法は、ポリマーシェルの本発明の物品を囲むことに続く吸着によって結合することを含んで提供される。

#### 【0022】

蛍光染料である染料を提供することも本発明のさらなる目的である。好ましくはこのような染料は疎水性であり、ポリマー粒子を染色するために使用可能である。もっとも好ましい染料はシアン染料である。標識を標識する、又は例えば抗体などの試薬の検出等の特定の目的のために、フロオレセイン (F I T C) 等の水溶性染料が使用できる。

#### 【0023】

紫外または可視領域での波長で光放射をする染料を提供することは本発明のさらなる目的である。赤外または近赤外領域で蛍光を発する染料を提供することは本発明のさらなる目的である。

#### 【0024】

約450 nmより長波長で、好ましくは約480 nmより長波長、さらに好ましくは約500 nmより長波長で光放射を持つ染料を提供することは本発明のさらなる目的である。好ましい染料は、ポリメチンシアニンまたはスクアレンであり、約500 nmから約1000 nmの領域の波長を持つ蛍光を発する。好ましくは、1つ以上のナノスフェアの集団を染色するために1つ以上の染料を使用する時、これらの染料は十分に異なった蛍光スペクトルを持ち、好ましくは10 nmを超える波長で分離される最大放射を持ち、より好ましくは25 nmを超える波長で分離される最大発光を持ち、さらに好ましくは50 nmを超える波長で分離されるように選択する。染料は商業的に入手可能なフィルタに合致し、または

いくつかの励起、放射バンドで多重フルオロフォアを検出するために合致する発光バンドを持つように選択できる。

【0025】

これらの粒子を様々な診断、分析、および当技術分野で知られている産業に適用するために使用する方法を提供することは本発明のさらなる目的である。対象の分析物の検出に使用できるようなキットを提供することは本発明のさらなる目的である。好ましくはこのキットははっきりした蛍光シグナルを持つナノ粒子と結合した微小粒子の系列を含み、対象の1つの分析物に特異的に結合する能力のある分析反応物を含む。このキットはまた分析物質として同じ分析物に結合する物質を含む第2の物質を含み、また本キットは蛍光標識競合分子、基準物質および洗浄緩衝液などの標準物質として受け入れられる他の材料、必要なプラスチック容器等を含む。

【0026】

抗原、抗体（モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方）、レセプター、ハプテン、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸、薬剤、ホルモン、化学物質、ポリマー、病原体、毒素、又はそれらの組合せでありうる広い意味で種々の分析物を検出し、分析することは本発明のさらなる目的である。

【0027】

本発明の多色粒子を使用している試料内の対象の分析物の多重副次集団を検出するための方法を提供することも本発明のさらなる目的である。

【0028】

本発明の上記およびさらなる目的によると、試料内の分析物の状況あるいは部分を検出し、区別し、分離し、定量し、及び／又は分析するためのもっとも好ましい方法はフローサイトメトリーである。

【0029】

視検、デジタル（CCD）カメラ、ビデオカメラ、写真フィルムに限定されないが含む、検出と分析のための他の方法を提供し、またはレーザースキャニング装置、フルオロメーター、ルミノメーター、感光性半導体素子（フォトダイオード）、量子計数器、プレートリーダー、エピフルオレセンス顕微鏡、走査性顕微

鏡、コンフォーカル顕微鏡、毛管電気泳動検出器等の流通機器の使用、またはフォトマルチプライヤーチューブまたは、存在、局在、強度、励起および放射スペクトル、蛍光偏光、蛍光寿命、および他の蛍光シグナルの物理的特性を検出可能な他の光学検出器などのシグナルを増幅するための他の方法、を提供することは本発明のさらなる目的である。

#### 【0030】

本発明の特定の実施形態において、第1の直径を有する微小粒子と、第1の直径より小さい第2の直径を持ち、ビーズに結合する複数の微小粒子を含んでなる物品が提供される。本発明の現実の実施形態において、異なる少なくとも標識分子の1つの型のあらかじめ決められた濃度、1つ以上の異なる標識分子の型のあらかじめ決められた濃度のいずれか、あるいは両方を持っているもう1つの物品から、物品を区別するために効果的なすでに決められた濃度の少なくとも1つの標識分子の型を持つ、微小粒子、少なくともナノ粒子の一部分、または両方が、あらかじめ決められた濃度がゼロから最大値までの範囲であってよいことを提供する。好ましい実施形態において、あらかじめ決められた濃度はゼロでないある値から最大値まで広がっている。最大値は与えられた標識分子タイプの物理的及び化学的特性を含む因子の数によって決定され、その特性は、微小粒子、ナノ粒子又はその双方に導入し、関連し又は組み込むことのできる標識分子の上限濃度を限定しうる。標識分子が蛍光染料を含むところでは、例えば、最大の効果的濃度を決定しうる染料の1つの特性は、可溶性あるいは吸収及び／または放射特性を含むスペクトル特性である。代替の実施形態においては、最大値は、微小粒子またはナノ粒子の表面上または内部分にある標識分子の飽和点に近づくか、または本質的に同等である。

#### 【0031】

本発明のさらに好ましい実施形態において、微小粒子に結合する多くのナノ粒子の数と量もまたあらかじめ決められている。さらに、ある場合において、多くのナノ粒子は微小粒子と共有結合で結合する。

#### 【0032】

本発明の他の目的は、本明細書に提供された開示を見ることで当業者に明らか

になるだろう。

### 【0033】

(具体的な実施形態の詳細)

本発明を開示し記述する前に、本発明が、本明細書で開示したプロセス工程に限定されず、ここに開示したプロセス工程および技術は変わりうることが理解されるべきである。また、本明細書で使用した技術は特定の実施形態を記述する目的のみで使用され、本発明の意図は添付された請求項とその等価物によってのみ限定されるので、この技術を限定する意図はないことが理解されるべきである。

### 【0034】

本明細書および添付された請求項で使用されているように、その内容が明らかに別に影響を与えない限り、単数形は複数の対象を含んでいる。したがって、例えば、「1つの粒子」を「1つの染料」で染色する方法という語は1つ以上の染料と1つ以上の粒子の混合物を含んで良い。

### 【0035】

粒子

担体微小粒子に結合する蛍光ポリマーナノスフェアを記述する。蛍光的に区別可能な粒子の集団はナノスフェア内の染料の量の変化を通じて得られる。微小粒子につながった望ましいナノスフェアの数、および担体粒子の表面上にある異なって染色されたナノスフェアの比は、特定の要求に従って選択される。

### 【0036】

本発明で用いられるナノスフェアは、直径約10ナノメートル (nm) から約100,000 nmの範囲のサイズで、商業的に入手可能である。最も好ましい直径は約10 nmと1,000 nmの間であり、好ましくは200 nmと500 nmの間である。ナノスフェアが結合する担体粒子として、本発明で用いられるポリマーミクロスフェアは、通常直径が0.01~1000マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ ) のサイズの範囲にある。微小粒子は任意のサイズをとって良いが、好ましいサイズは0.1~500  $\mu\text{m}$  であり、より好ましくは1~200  $\mu\text{m}$  であり、さらに好ましくは2~12  $\mu\text{m}$  である。この粒子は均一 (ほぼ同じサイズである) かまたはその差異が光散乱または光屈折等のサイズ依存特性によって決定でき

るような可変サイズである。

【0037】

粒子は任意に、一定に整形された物質からできている。好ましい形状は球状であるが、しかし、このパラメータは本発明の本質において重要ではないので、他の形状の粒子が使用できる。粒子の形状は追加的な分別パラメータとして役割を果たすことができ、フローサイトメトリー、すなわち高分離能スリットスキャニング法によって分別される。

【0038】

通常は、担体粒子と同様にこれらのナノスフェアはポリスチレンまたラテックス等の同一の物質から成る。しかしながら、他のポリマー物質は、カルボン酸基本ポリマー、ポリ脂肪族アルコール、ポリ（ビニル）ポリマー、ポリアクリル酸、ポリ有機酸、ポリアミノ酸、コポリマー、ブロックコポリマー、3量体ポリマー、ポリエーテル、天然ポリマー、ポリイミド、界面活性剤、ポリエステル、分岐鎖ポリマー、環状ポリマー、ポリアルデヒド、およびその混合物からなる化学的な群から選択されたポリマーを含むことが容認される。さらに具体的には、臭素処理ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアクリルアミド、ポリアクロレイン、ポリブタジエン、ポリカプロラクトン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリジメチルシロキサン、ポリイソプレン、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピリジン、ポリビニルベンジルクロライド、ポリビニルトルエン、塩化ポリビニリデン、ポリジビニルベンゼン、ポリメタクリル酸メチル、ラクチド-グリコリド共重合体、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリホスファーズ、あるいはその組合せが好ましい。ポリマー粒子が構成している代表的な組合せポリマーは、例えば、スチレン-塩化ビニルベンゼン-アクリル酸共重合体（85：10：5 モル比）、スチレン-アクリル酸共重合体（99：1 モル比）、スチレン-メタクリル酸共重合体（90：10 モル比）、スチレン-アクリル酸-m&p-ジビニルベンゼン共重合体（89：10：1 モル比）、スチレン-2-カルボキシエチルアクリル酸共重合体（90：10 モル比）、メチルメタクリル酸-アクリル酸共重合体（70：30 モル

比) およびスチレン-ブチルアクリル酸-メタクリル酸共重合体(45:45:10 重量比)を含む。ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、またはラテックス等の合成ポリマーから形成されるほとんどのビーズは、現在Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.) およびLKB Produkter (Stockholm, Sweden) などのいくつかの会社より商業的に入手できる。天然の巨大分子から形成されたビーズと、アガロース、架橋アガロース、グロブリン、デオキシリボ核酸、およびリボソーム等の粒子はBio-Rad Laboratories、Pharmacia (Piscataway, NJ) およびIBF (France) 等の会社より商業的に入手できる。ポリアクリルアミドとアガロースのコポリマーで形成されるビーズはIBFとPharmacia等の会社より商業的に入手できる。

#### 【0039】

これらのポリマーはまた磁石あるいは過常磁性、常磁性、または強磁性金属酸化物を含むグループから選択した磁気応答性の金属酸化物を組み込んでも良い。磁気ビーズはDynal Inc. (Great Neck, NY) 等の会社より商業的に入手でき、または例えば米国特許第4,358,388号、第4,654,267号、4,774,265号、5,320,944号、第5,356,713号で開示されたような当技術分野で知られている方法を用いて調製できる。

#### 【0040】

例えばカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース等の炭化水素、タンパク質のポリマー、ポリペプチド、原核および真核細胞、ウイルス、脂質、金属、レジン、ゴム、シリカ、例えばポリジメチルジフェニルシロキサン等のシリコン、ガラス、セラミック等の他の物質が同様に使用できる。

#### 【0041】

ナノ粒子は好ましくは微小粒子と同じ物質から作られる。しかしながら、もし必要ならば、異なる物質から作成しても良い。本明細書において、微小粒子およびナノ粒子を含むポリマー種に対して「第1の」および「第2の」という語を適

用したときは、識別の目的のためのみに使用し、優先順位を示すわけではないことを理解すべきである。

#### 【0042】

微小粒子はまた、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリル酸、トリメチロールプロパントリメタクリル酸、N, N' メチレンビスアクリルアミド、または当技術分野で知られている他の機能的に同等な物質のような、架橋剤をおよそ0%~50%含む。ヒドロキシプロピルセルロースなどの炭化水素ポリマーの架橋は、アジピン酸、セバシン酸、コハク酸、クエン酸、1, 2, 3, 4-ブタンテトラカルボン酸、あるいは1, 10-デカンジカルボン酸によって行われる。好ましい実施形態において、コアのミクロスフェアとナノスフェアはポリスチレンからなり、約0%~30%のジビニルベンゼンを含む。

#### 【0043】

粒子は、付着し結合することを促進するための付加的な表面官能基を持っている。これらの基はカルボン酸、エステル、アルコール、カルバミド、アルデヒド、アミン、硫黄酸化物、窒素酸化物、あるいはハロゲン化合物を含んでよい。カルボン酸ラテックス粒子は例えば米国特許第4, 181, 636号で記載されたように診断物質を調製するために用いられた。その中に記載されたように、表面カルボキシル基を持っている粒子に免疫学的に反応性の種を共有結合でつけるための従来の手法は、水溶性カルボジイミドの使用を含む。多くの実用的な適用に対して、ポリマー粒子が反応性のアミンまたはスルホヒドロキシル含有化合物の結合を可能にする表面カルボキシル基を持つことが重要である。このような基は、好ましくはこのような基を含むモノマーをポリマーに組み込むことによって（例えばアクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸およびその類似物）粒子に加えられる。あるいは、これらの基は、カルボキシル基に変換できる他の前駆体反応基を持っているポリマーのさらなる化学的反応によって（例えば、無水マレイン酸などの無水物の加水分解によって、または表面のメチロールあるいはアルデヒド末端基の酸化によって）粒子に加えられる。ジアミン、ジヒドラジド、メルカプトアルキルアミン、およびジメルカプタン等の他の化合物が、薬剤、酵素あるいはナノスフェアなどの他の反応種の後の結合のための連結部分として



使用されうる。好ましい結合あるいは結合方法は共有結合連結によるものであるが、吸着などの他の方法が同等に使用されうる。ポリマーシェルのによって微小粒子-ナノ粒子複合体を取り囲むような他の新規な方法も同様に許容される。

#### 【0044】

##### 染料

本発明で使用される蛍光染料はシアニン染料として知られている一般的なクラスからなり、550 nmと900 nmの間の放射波長を持つ。これらの染料はメチン基を含んでよく、これらの数は染料のスペクトル特性に影響する。ピリジンであるモノメチン染料は一般的に青色から青-緑色蛍光放射を持ち、一方キノリンは緑色から黄色-緑色蛍光放射を持つ。トリメチン染料類似体は本質的に赤色波長に移動し、ペンタメチン染料はたとえ移動しても赤外蛍光放射を示す（例えば米国特許第5,760,201号を参照のこと）。

#### 【0045】

しかしながら、有機溶媒に可溶性の任意の染料が使用されうる。スクアレン酸ベースの蛍光染料は文献に記載されている方法によって合成されうる。例えば、Sprenger et al. Angew. Chem., 79, 581 (1967); Angew. Chem., 80, 541 (1968); Maaks et al., Angew Chem. Intern. Edit., 5, 888 (1966)を参照のこと。さらに、非対称に置換されたスクアレン酸化合物は Law et al., J. Org. Chem. 57, 3278, (1992)に記載されているような方法によって合成されうる。このような染料のいくつかを作成する特定の方法は当技術分野でよく知られており、例えば米国特許第5,795,981号、第5,656,750号、第5,492,795号、第4,677,045号、第5,237,498号、および第5,354,873号で見ることができる。例えばフタロシアニン、2,3-ナフタロシアニン、スクアレンおよびクロコン酸誘導体などの上記記載の蛍光染料の実際の使用は、Krutakらに付与された米国特許第5,525,516号に開示されている。

#### 【0046】

この好ましい実施形態において使用された蛍光染料に加えて、関連する染料をシクロブテンジオン誘導体、置換セファロsporin化合物、フッ素化スクアレン混合物、対象および非対称スクアレン、アルキルアルコキシスクアレン、スクアリリウム化合物からさらに選択してよい。これらの染料のいくつかは約1,000 nmまでの放射スペクトルの範囲が効果的に広がる可能性のある赤外波長と同様に赤外近くで蛍光を発する。スクアレン、すなわちスクアレン酸から由来したものに加えて、フタロシアニンとナフタロシアニン等の疎水性染料もまたより長い波長で扱うように選択してもよい。フルオロクロムの他のクラスが本発明に従う染料としての使用に同様に適用する。これらの染料のいくつかは本明細書の以下に列挙する。3-ヒドロキシピレン 5, 8, 10-三硫酸、5-ヒドロキシトリプタミン、5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT)、アシッドフーシン (Acid Fuhsin)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、アクリジンレッド (Acridine Red)、アクリジンイエロー (Acridine Yellow)、アクリフラビン (Acriflavin)、AFA (アクリフラビンフェールゲン SITSA)、アリザリンコンプレキソン (Alizarin Complexon)、アリザリンレッド (Alizarin Red)、アロフィコシアニン (Allophycocyanin)、ACMA、アミノアクチノマイシン D (Aminoactinomycin D)、アミノクマリン (Aminocoumarin)、アントロイルステアリン酸 (Anthroyl Stearate)、アリルーまたはヘテロアリルー置換ポリオレフィン、アストラゾンブリリアントレッド 4G (Astrazon Brilliant Red 4G)、アストラゾンオレンジ R (Astrazon Orange R)、アストラゾンレッド 6B (Astrazon Red 6B)、アストラゾンイエロー 7GLL (Astrazon Yellow 7GLL)、アテブリン (Atabrine)、オーラミン (Auramine)、オーロホスフィン (Aurophosphine)、オーロホスフィンG (Aurophosphine G)、BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール)、BCECF、硫酸ベルベリン (Berberine Sulphate)、ビスベンザミド (Bisbenzamide)、BO

BO 1、ブランコフォア FFG溶液 (Blancophor FFG Solution)、ブランコフォア SV、ボディファイ F1 (Bodipy F1)、BOPRO 1、ブリリアントスルフォフラビン FF (Brilliant Sulphoflavin FF)、カルセインブルー (Calcien Blue)、カルシウムグリーン (Calcium Green)、カルコフルオア RW 溶液 (Calcofluor RW Solution)、カルコフルオアホワイト (Calcofluor White)、カルコフルオアホワイト ABT 溶液 (Calcofluor White ABT Solution)、カルコフルオアホワイト標準溶液 (Calcofluor White Standard Solution)、カルボシアニン (Carbo cyanine)、カルボスチリル (Carbostyryl)、カスケードブルー (Cascade Blue)、カスケードイエロー (Cascade Yellow)、カテコールアミン (Catecholamine)、チナクリン (Chinacrine)、コリホスフィン O (Coriphosphine O)、クマリン (Coumarin)、クマリナーファロイジン (Coumarin-Phalloidin)、CY3. 1 8、CY5. 1 8、CY7、Dans (1-ジメチルアミノナファリン5スルホン酸)、Dansa (ジアミノナファチルスルホン酸)、ダンシルNH-CH<sub>3</sub>、DAPI、ジアミノフェニルオキシジアゾール (DAO: Diamino Phenyl Oxydiazole)、ジメチルアミノ-5-スルホン酸 (Dimethylamino-5-Sulphonic acid)、ジフッ化ジピロメテンボロン (Dipyrrometheneboron Difluoride)、ジフェニルブリリアントフラビン 7GFF (Diphenyl Brilliant Flavine 7GFF)、ドーパミン (Dopamine)、エオシン (Eosin)、エリスロシン ITC (Erythrosin ITC)、臭化エチジウム (Ethidium Bromide)、オイクリシン (Euchrysin)、FIF (ホルムアルデヒド誘導フルオレセンス Formaldehyde Induced Fluorescence)、フラゾオレンジ (Flazo Orange)、フルオ 3 (Fluo 3)、フルオレスカミン (Fluore

scamine)、Fura-2、ゲナクリルブリリアントレッド B (Genacryl Brilliant Red B)、ゲナクリルブリリアントイエロー 10GF (Genacryl Brilliant Yellow 10 GF)、ゲナクリルピンク 3G (Genacryl Pink 3G)、ゲナクリルイエロー 5GF (Genacryl Yellow 5GF)、グロキサン酸 (Gloxalic Acid)、グラニューブルー (Granular Blue)、ヘマトポルフィリン (Haematoporphyrin)、ホエチェスト33258 (Hoechst 33258)、Indo-1、イントラホホワイト Cf 液体 (Intrawhite Cf Liquid)、ロイコフォア PAF (Leucophor PAF)、ロイコフォア SF (Leucophor SF)、ロイコフォア WS (Leucophor WS)、リサミンローダミン B200 (RD200:Lissamine Rhodamine)、ルシファイエロー CH (Lucifer Yellow CH)、ルシファイエロー VS (Lucifer Yellow VS)、マグダラレッド (Magdala Red)、マリーナブルー (Marina Blue)、マキシロンブリリアントフラビン 10 GFF (Maxilon Brilliant Flavin 10 GFF)、マキシロンブリリアントフラビン 8 GFF (Maxilon Brilliant Flavin 8 GFF)、MPS (メチルグリーンピロニンスチルベン:Methyl Green Pyronine Stilbene)、ミトラマイシン (Mithramycin)、NBD アミン、ニールレッド (Nile Red)、ニトロベンゾキシアジドール (Nitrobenzoxadidole)、ノルアドレナリン (Noradorenaline)、ニュークリアファストレッド (Nuclear Fast Red)、ニュークリアイエロー (Nuclear Yellow)、ニロサンブリリアントフラビン E8G (Nylosan Brilliant Flavin E8G)、オレゴングリーン (Oregon Green)、オキサジン (Oxazine)、オキサゾール (Oxazole)、オキサジアゾール (Oxadiazole)、パシフィックブルー (Pacific Blue)、パラロサニリン (フュールゲン) (Pararos

aniline (Feulgen))、ホルワイト AR 溶液 (Phorwite AR Solution)、ホルワイト BKL (Phorwite BKL)、ホルワイト Rev (Phorwite Rev)、ホルワイト RPA (Phorwite RPA)、ホスフィン 3R (Phosphine 3R)、フタロシアニン (Phthalocyanine)、フィコエリスリン R (Phycoerythrin R)、ポリアザインダセンポントクロームブルーブラック (Polyazaindacene Pontochrome Blue Black)、ポルフィリン (Porphyrin)、プリムリン (Primuline)、プロシオンイエロー (Procion Yellow)、ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodid)、ピロニン (Pyronine)、ピロニン B (Pyronine B)、ピロザールブリリアントフラビン 7GF (Pyrozal Brilliant Flavin 7GF)、キナクリンマスタード (Quinacrine Mustard)、ローダミン 123 (Rhodamine 123)、ローダミン 5 GLD (Rhodamine 5 GLD)、ローダミン 6G (Rhodamine 6G)、ローダミン B (Rhodamine B)、ローダミン B 200 (Rhodamine B 200)、ローダミン B エクストラ (Rhodamine B Extra)、ローダミン BB (Rhodamine BB)、ローダミン BG (Rhodamine BG)、ローダミン WT (Rhodamine WT)、ローズベンガル (Rose Bengal)、セロトニン (Serotonin)、セブロンブリリアントレッド 2B (Sevron Brilliant Red 2B)、セブロンブリリアントレッド 4G (Sevron Brilliant Red 4G)、セブロンブリリアントレッド B (Sevron Brilliant Red B)、セブロンオレンジ (Sevron Orange)、セブロンイエロー L (Sevron Yellow L)、SITS (プリムリン (Primuline))、SIT S (スティルベンイソチオスルホン酸 (Stilbene Isothiosulphonic acid))、スチルベン (Stilbene)、Snarf 1、スルホローダミン B カン C (Sulpho Rhodamine

B Can C)、スルホローダミン G エクストラ (Sulpho Rhodamine G Extra)、テトラサイクリン (tetracycline)、テキサスレッド (Texas Red)、チアジンレッド R (Thiazine Red R)、チオフラビン S (Thioflavin S)、チオフラビン TCN (Thioflavin TCN)、チオフラビン 5 (Thioflavin 5)、チオライト (Thiolite)、チオゾールオレンジ (Thiozol Orange)、チノポール CBS (Tinopol CBS)、TOTO 1、TOTO 3、トゥルーブルー (True Blue)、ウルトラライト (Ultralite)、ウラニン B (Uranine B)、ユービテックス SFC (Uvitex SFC)、キシレンオレンジ (Xylene Orange)、XRITC、YO PRO 1、あるいはこれらの組合せである。さらにこれらの染料は、任意に生体分子あるいは活性化エステル、イソチオシアネート、アミン、ヒドラジン、ハロゲン化物、酸、アジド、マレイミド、アルコール、アクリルアミド、ハロアセタミド、フェノール、チオール、酸、アルデヒド、ケトンを含んでいるポリマーに典型的に見られる官能基を持つ安定蛍光産物を形成するのに適した官能基を含んでいるであろう。

#### 【0047】

当業者は間違いなく、それらの疎水性特性と同様に放射と吸収特性が適切である限りは、これらの染料間でどれを選択するか知るであろう。蛍光染料のスペクトル特性は励起波長と強度において、同様のフローサイトメトリー装置での使用を許容するために、フルオレセインあるいはローダミン誘導体と十分に類似しているべきである。しかしながら染料は有機溶媒に高い溶解性を持ち、改善された光安定性と飛躍的な収率を持つことが好ましい。

#### 【0048】

さらに好ましくは、染料は同一または重なっている励起スペクトルを持つが、識別できる放射波長を持つ。任意の検出系が、2つの染料間のスペクトルの特性の差異を検出するために使用でき、これには検出系を履行するために、固相状態検出器、フォトマルチプライヤーチューブ、写真フィルム、または視覚、スペクトロメーター、ルミノメーター顕微鏡、プレートリーダー、蛍光スキャナ、フロ

ーサイトメーター、あるいはこれらの組合せ等の追加的な機器とともに使用される任意のものが含まれる。好ましくは、染料は本質的に異なる放射スペクトルを持つように選択し、好ましくは10 nmを超えて分離される最大放射を、より好ましくは25 nmを超えて分離される最大放射を、さらに好ましくは50 nmを超えて分離される最大放射を持つ。2つの染料の区別が視検で行われる場合は、2つの染料は好ましくは視覚識別を高めるために、知覚できるほど異なった色の放射波長を持つ。機器方法を用いた2つの染料間の区別が望ましいときは、フィルターおよび回折格子の変更によりそれぞれの最大放射が独立して検出されるようになる。2つの染料が類似の最大放射を持つように選択した場合、機器による区別は両方の染料の放射スペクトルが同様の統合振幅、同様のバンド幅を持つことを保証することで、また機器の系の光学的処理量は2つの染料の放射範囲を通して同等であることで高めることができる。機器による区別はまだ広いバンド幅よりも狭いバンド幅を持つ染料を選択することで高めることができ、しかしながらそのような染料は必ず高振幅放射を持つか、統合シグナル強度の欠失がシグナル検出にとって好ましくないことがないような十分な濃度で存在しなければならない。

#### 【0049】

##### 染色工程

当技術は、当業者に対して独特の蛍光特性を持つ多色の蛍光粒子の系列を作ることが可能にし、このような粒子を多数の分析物の多パラメータ分析に使用することが開示される。本技術により、微小粒子とナノ粒子双方は異なる染料で染色している蛍光をもってよい。好ましい実施形態において、ナノ粒子は染色され、さらに好ましくは1つ以上のナノ粒子の集団が1つ以上の異なる蛍光染料を持つよう提供される。ポリマー粒子の蛍光染色は当業者によく知られる任意の技術によって行われてよい。蛍光粒子を作製する異なった3つの方法が先行技術で開示され、それには(i)粒子表面上への染料の共有結合(ii)粒子重合間での染料の内部への組み込み(iii)粒子がすでに重合した後の染色、が含まれる。

(i) 米国特許第5,194,300号 Cheung; 米国特許第4,774,189号 Schwartz 例えば蛍光ミクロスフェアを1つ以上の蛍光

染料をその表面に共有結合することでコートすることを開示する。

(i i) 米国特許第5, 073, 498号 Schwartz; 米国特許第4, 717, 655号 Fulwyler 蛍光染料を粒子重合工程の間に添加することを開示する。

(i i i) 第3の方法の原理、すなわち粒子がすでに重合した後に染料を内部に埋め込むか拡散することは、最初にL. B. Bangs (均一なラテックス粒子; Seragen Diagnostics Inc. 1984, p. 40) によって記載された。Hauglandらに付与された米国特許第5, 723, 218号はBangs法と本質的に類似した工程を用いて1つ以上のジピロメテンボロン2硫酸染料で拡散させて微小粒子を染料化することを開示する。上記方法の組合せもまた可能であり、これらの例は例示のために提示し、限定するものではない。このような技術の1つを本明細書で記述する。

#### 【0050】

1% w/wのナノスフェア溶液(直径300 nmポリエチレン、アミノ官能性化)を丸底フラスコ内で攪拌する。これにクロロホルムなどの有機溶媒中の染料を加える。染料溶液がそれ以上ナノスフェアに吸収されなくなったならば、染料を加えるのをやめて容器を減圧下に移動させる。

#### 【0051】

もう一つの実施形態では2つの蛍光染料、例えば1, 3-ビス[(1, 3-ジヒドロ-1, 3, 3-トリメチル-2H-インドール-2-イリデン)メチル]-2, 4-ジヒドロキシーシクロブテンジイリウム、ビス(分子内塩)である赤色スクアレン染料と2-(3, 5-ジメチルピロール-2-イル)-4-(3, 5-ジメチル-2H-ピロール-2-イリデン)-3-ヒドロキシー-2-シクロブテン-1-オンであるオレンジ色スクアレンを使用する。これらの染料はナノスフェアの2つの分離した集団を染色するのに使用する。又は、ナノスフェアの1つの集団と担体ミクロスフェアを染色する。さらには、2つの染料は与えられた集団のいくつかの粒子内で異なる比によって化合する。

#### 【0052】

特定の染料を用いた最適な染色は、査定されているプロパティと同様に、個々



の染料あるいはポリマー基質と反応溶液の物理的、化学的特性に依存する。インキュベーション時間は、望ましい結果、染料および粒子の濃度、並びに反応条件にとっても広く依存する可能性がある。最適な時間は、通常は染料にとって要求される最小限の時間であって、使用している濃度において、時間を過ぎてからの染料の崩壊をさけ、染料による他のすべての好ましくない蛍光シグナルを最小化する一方で、もっとも高い特定のシグナルを得るためのものである。

【0053】

染料の合計量は粒子の重量に対して重量で約0.00001%と15%の間である。しかしながら、この制限は、前記染料で飽和した粒子が安定であり、その意図した目的に対して有用である限りは本発明にとってはあまり重要ではない。

【0054】

両方の染料が好ましくは同じ吸収波長、例えば紫外から約800 nmまでの範囲で励起され、それぞれ少なくとも10 nm、好ましくは30 nm、さらに好ましくは少なくとも50 nm離れている、2つの異なった本質的には重ならない波長で蛍光を放射するだろう。例えば、染料#1の放射ピークは585 nmであり、染料#2の放射ピークは630 nmである。

【0055】

あるいは、本発明の染料は、目的染料との組合せで使用するのが望ましい他の物質の応答と異なった検出可能な応答を示すように選択される。例えば、600 nm以下で励起される複合体からの染料は、一緒に使用されるフルオレセインイソシアネートまたはフィコエリスリンで標識されたような蛍光抗体と組合せて使用できる。

【0056】

任意の蛍光検出系（視検も含む）が感度のレベルは異なるが、染料間のスペクトル特性の差異を検出するために使用できる。このような差異は、最大励起の差異、最大放射の差異、蛍光寿命の差異、同一の励起波長または異なった波長での蛍光放射強度の差異、吸収度の差異、蛍光偏光度の差異、標的物質との組合せにおけるまたはその組合せにおける蛍光増加の差異を含むがこれらに限定されない。検出可能な異なる染料は、任意に異なるスペクトル特性と異なる感度を持つ

ている本発明の染料の1つである。本発明の1つの特徴において、染料-粒子複合体と付加的な検出物質は同一か重なった励起スペクトルを持つが、一般的には $>10\text{ nm}$ 、好ましくは $>20\text{ nm}$ 、さらに好ましくは $>50\text{ nm}$ で分離する最大放射を有する明らかに異なった放射スペクトルを持っている。すべての蛍光試薬の同時に起きる励起は、それぞれの試薬に対しては最適状態ではないが試薬の組合せに対しては最適である波長で、試料の励起を要求する。あるいは、付加的な試薬は目的の染料を励起するために使用したものと異なる波長で、同時にまたは逐次的に励起されうる。さらにまたは、1つ以上の付加的物質を染料放射を消滅させるか部分的に消滅させるのに用いられる。

【0057】

好ましい実施形態において、塩素化溶媒、さらに好ましくはクロロホルムを染料を可溶性にするために使用する。しかしながら、適切な溶媒は対象の疎水性染料の特定のクラスを可溶化させる能力に基づいて選択する。溶媒はアクリル、脂肪族、環状脂肪族、芳香族、またはヘテロ環状炭化水素でよく、溶媒は、環または鎖の末端基または内部分のどちらかとしてハロゲン、酸素、硫黄、窒素および/またはリンを持っていたりもよいが持っていなくてもよい。特に、アルコール、エチルアセトン、トルエン、キシレン、ヘキサン、ペンタン、ベンゼン、エーテル、アセトン、オイル、四塩化炭素、二硫化炭素、DMSO、または塩化メチレン等の溶媒を使用できる。本発明分野で知られている他の溶媒が使用でき、M e r c k I n d e x (E l e v e n t h E d i t i o n, M I S C-63-68セッションを参照のこと)に列記されている様々な溶媒から選択してよい。

【0058】

結果として染色されたナノスフェアは、カルボジイミドカップリング（以下を参照のこと）等の任意のよく知られているカップリング反応によって染色された、又は染色されていないミクロスフェアに結合する。カルボン酸、エステル、アルコール、カルバミド、アルデヒド、アミン、硫黄酸化物、窒素酸化物、またはハロゲン化物を用いた他のカップリング方法も本技術分野でよく知られている方法によって同様に使用できる。

【0059】

### 本発明の物品の使用方法

本発明は、多数の蛍光シグナルを有する一つ以上のナノ単位の粒子を担持する担体微小粒子を含んでなる蛍光ポリマー物品を提供する。任意に、本発明の担体微小粒子は異なる蛍光染料によって染色することもできる。このような物品を得るためには、担体粒子に、形状と構成を無視して平均直径約100～500ナノメートルという大きさの、より小さな蛍光粒子（ナノ粒子）多数でもって（共有結合で、もしくは吸着で）被膜を施す。さらにこの物品は、光の吸収及び発散特質に何ら影響を与えることがないように選択された薄いポリマー性シェルによって被膜を施され、もしくは包み込まれる（囲まれる）ことができる。これは、以下に述べる二種類の別個の方法によって達成される。

#### 【0060】

本発明の蛍光ナノ粒子は、一種類の蛍光染料を混ぜ、異なる割合の一つ以上のナノ粒子集団を組合せることによって調製しうる。あるいは、同じ粒子内に二つ以上の蛍光染料の組合せを用いて、多蛍光ナノ粒子を得ることもできる。これらの蛍光ナノ粒子の蛍光強度は、用いる蛍光染料の量を変えていくことによって調節することができる。これら双方の粒子の表面には、さらに改質し、官能基もしくは化学結合が取り付くような所望の表面特質を与えることができる。

#### 【0061】

フローサイトメトリー測定の目的に加えて、このような特質を有する蛍光粒子は、様々な生物医薬の適用において有用である。本発明によって得られる多色蛍光微小粒子を使うことを基本とする分析方法もまた提供される。少なくとも二つの蛍光シグナルによって特徴づけられる微小粒子の集団の各々は、臨床もしくは試験試料の中に存在する対象となる特定の分析物と結合することができる分析反応物と結合した場合には、強力な分析ツールが得られることになり、量的、質的分析結果を提供することができる。試料中の複数の分析物に行なう真にマルチプレックスな分析を達成するには、対象の分析物と結合することができる第三のタイプの蛍光シグナル、例えば通常標識試薬中に見出されている緑色蛍光シグナル（F I T C）を用意する。ここで規定される標識試薬は、二つの機能を有している。それは分析物と反応する能力と、蛍光シグナルを提供する能力であり、この

蛍光シグナルは本発明の物品の蛍光シグナルとは異なっている。通常のフローサイトメーターは、1秒あたり2,000個の粒子以下の発光特性（蛍光シグナル）を分析することができ、リアルタイムのスケールで信頼できる量的データを提供することができる。このように、多色微小粒子の製造方法、微小粒子そのもの、このような微小粒子の複数のセット、及び試料中の多くの分析物を分析するマルチプレックスな方法を、本発明は特許請求している。

#### 【0062】

本発明の蛍光物品は、生物学的物質、即ちハプテン、抗原、抗体、酵素又は核酸のような分析物もしくは分析反応物、の不動あるいは共有結合のカップリングに用いることができ、免疫検定、核酸（DNAもしくはRNA）検定、親和性精製、細胞分離のような様々なタイプの分析物分析、及びその他の医療用、診断用及び産業用用途に用いることができる。

#### 【0063】

数多くのプロトコルが、100個以上のアミノ酸からなるタンパク質、100個以下のアミノ酸からなるペプチド、多糖、核酸、有機薬剤、無機薬剤、細胞及び組織を含む対象の様々な分析物を検出するために存在する。プロトコルには、シグナルを生み出す系の使用が含まれている。この系には、直接的もしくは間接的に検出される標識共役体が含まれる。これらの技法は染料、酵素、酵素基質もしくは補助因子、酵素阻害剤、蛍光物質、化学発光物質、粒子等を用いる場合がある。

#### 【0064】

分析物と分析反応物の対は、例えば、対の一つが分析物又はその他の結合パートナーでありうる以下の組合せから選択される；即ち、抗原と特異的抗体；ホルモンとホルモン受容体；ハプテンと抗ハプテン；ポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチド；ポリヌクレオチドとポリヌクレオチド結合タンパク質；ビオチンとアビジンもしくはストレプトアビジン；酵素と酵素補助因子；レクチンと特異的炭化水素である。これ以後に用いる用語、分析物とは、測定することになる化合物又は組成物のことで、一価又は多価で、一つ又は多数の決定部位を有し、ハプテン性又は抗原性の、単独の化合物又は少なくとも一つの共通抗原決定部位

又は決定部位を共有する多数の化合物、又は受容体である。これ以後に用いる用語、受容体とは、分子に見られる特定の空間及び極性を有する機構、即ちエピトピック又はディターミナント部位を認識する（強い結合親和性を有する）巨大分子化合物もしくは組成物のことである。例示の受容体には、天然の受容体、例えばチロキシン結合グロブリン、抗体、酵素、免疫グロブリン（F a b）断片、レクチン、細胞表面に見出される様々なタンパク質（白血球分類細胞表面分子もしくはCD分子等を含んでいる。CD分子は、白血球細胞の表面上にある既知及び未知のタンパク質を示している、例えば、CD 4 は最初にヘルパーTリンパ球を決定する分子である。用語、抗体は、より一般的に受容体を示すために例証となるような場合において用いられている。翻って、用語、リガンドは、受容体がそれに対して天然のもしくは調製される化合物もしくは基質のことである。

#### 【0065】

ハプテンには、天然のホルモン、天然の薬物、合成薬物、汚染物質、アレルゲン、影響因子、成長因子、ケモキネシス、サイトカイン、リンフォカイン、アミノ酸、オリゴペプチド、化学的中間体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等を含んでいる。このような化合物は、弊害を起こす薬物、治療投与量のモニター、健康状態、移植目的のドナーマッチ、妊娠（例えば、h C G もしくは $\alpha$ -フエトタンパク質）の検出、疾病、例えばエンドトキシン、癌抗原、病原菌等の検出に用いられる場合がある。治療薬には、以下に限定されないが、抗-A I D S 剤、抗癌剤、抗菌剤、抗ウィルス剤、酵素阻害剤、神経毒素、オピオイド、睡眠剤、抗ヒスタミン剤、トランキライザー、抗痙攣剤、筋肉弛緩剤及び抗パーキンソン剤、抗鎮痙剤及び筋肉収縮剤、縮瞳剤及び抗コリン剤、免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン）抗緑内障溶液、抗寄生虫及び／もしくは抗原生動物溶液、高血圧剤、鎮痛剤、抗発熱剤、抗炎症剤（N S A I D のような）、局所麻酔剤、目薬、プロスタグランジン、抗鬱剤、抗精神病剤、抗嘔吐剤、造影剤、特異的標的剤、神経伝達物質、タンパク質及び細胞反応改質剤が含まれる場合がある。対象のタンパク質は、細胞集団、血液型、病原菌、病原菌に対する免疫反応、免疫複合体、サッカリド、レクチン、天然の受容体等の検出のような、広い範囲の診断に用いられている。受容体は、ハプテン、タンパク質、他の受容体等との結合、生理

的液体中における病原菌の存在、特定のタンパク質レベル、生理的溶液、大気、工程気流、水などのような様々な試料に含まれるハプテンの存在の検出に用いられている。核酸は、相補的鎖、核酸に特異的に結合するタンパク質等の検出に用いられている。

#### 【0066】

分析反応物は、生理的溶液の特質を規定する様々な無機分析物、大気、水等、例えば $O_2$ 、 $CO_2$ 、pH、 $Ca^{++}$ 、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Cl^-$ と反応する蛍光リポーター分子の中から選択される。このことは、van den Enghらに対して発行された米国特許第5,747,349号の中の例に開示されている。

#### 【0067】

特に興味を引くことは、ウィルス、原核動物及び真核動物の細胞、単細胞及び多細胞生物細胞、例えば菌、動物、哺乳動物など、もしくはその断片を含む微生物と細胞の結合である。通常、これらの大きな凝集は、対メンバーの複合体の特異的結合を通して表面に非-共有結合することになる。表面へ結合する結合メンバーを高密度にすることによって、細胞、ウィルス又は断片の非常に強い固定力を提供する、多数の結合対メンバーによって細胞又はウィルスは複合体を作る。次にこの系に、非特異的結合物質が容易に除去される間に、特異的結合の存在を無視して激しい処置をほどこしうる。

#### 【0068】

本発明の主題は、病原菌の検出にも用いられる。モノクローナル抗体は、表面に結合して捕捉抗体として働きうる。試料を添加して、抗体によって認識される抗原決定基を有する細胞を、表面上にある抗体に結合させる。非特異的結合病原菌は、特異的結合病原菌のみを残して洗い流されることになる。捕捉抗体によって認識される抗原決定基以外の抗原決定基に特異的な、標識を施されたモノクローナル抗体を次に添加する。用語、抗原決定基 (epitope) とは、用語、抗原決定基 (antigenic determinant) と同義で、ここで使用する際には、反応及び結合部位として働く、分子上にある既定ドメインを意味している。分子は、一つ以上の抗原決定基を有している場合がある。例えば、第一抗原決定基は分析物の各々の分析反応物とカップリングし、第二抗原決定基

は標識試薬に対し、結合部位もしくはドメインを提供する。対照的に、競合分子は、分析物-分析反応物結合対の形成を阻止（競合）することになる。抗体と病原菌との間に反応を引き起こさせるように培養した後、非特異的結合を起こした抗体を洗い流し、標識の存在を、標準的な検出方法に従って決定することになる。対象の病原菌は、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、トガウイルス、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、及びレトロウイルスのようなウイルスである。これらには、以下に限定されないが、大腸菌 (*Escherichia coli*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、エンテロバクター クロアツシエ (*Enterobacter cloacae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、エンテロコッカス ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、セラチア マルセセンス (*Serratia marcescens*)、マイコバクテリウム ボヴィス (*Mycobacterium bovis*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、及びプロテウス ヴルガリス (*Proteus vulgaris*) を含む細菌がある。このような病原菌の例は、上記病原菌に限られたものではなく、当業者は、どの微生物及び寄生虫の特定種が特別に重要なものであるかということがわかるだろう。これらの生物及び関連疾病の排他的リストは、Warinner に対して発行された米国特許第5,795,158号の中の例に見出すことができ、これは参照によって本明細書に取り込まれる。

#### 【0069】

対象もしくは分析物の標的分子の定量もしくは検出に際し、試料を微小粒子を含有している溶液とあわせ、微小粒子上の巨大分子を分析物と反応させて、微小粒子を試料の非結合成分から分離させ、結合分子を含有している微小粒子を従来の方法によって検出する。蛍光によって染色された微小粒子は特に、当業者に知られている方法に従ってフローサイトメトリの検定によく適しているものであ

る。

#### 【0070】

本発明の方法において用いられる担体粒子のコーティングは、例えばこの分野で標準的な工程を用いて実施できる。このように例えば、免疫分析工程において用いられている抗体を使う粒子コーティング系の代表的技法は、Frenghenらによって、Clin. Chem. 39 (1993)、pp. 2174-2181と、ここに含まれる参考文献、及びLindmoらによってJ. Immunol. Methods 126 (1990)、pp. 183-189に記載されている。

#### 【0071】

本発明の粒子を用いる分析は、尿、脳脊髄液、胸膜液、滑膜液、腹膜液、羊膜液、胃液、血液、血清、血漿、リンパ液、間隙液、組織ホモジネート、細胞抽出物、唾液、精液、大便、生理分泌物、涙、粘液、汗、膺分泌物、潰瘍及び表面吹き出物、水泡、膿腫由来体液、正常、悪性標本、対象の分析物を含む可能性がある身体の疑わしい組織もしくは構築物を含む組織の抽出物のような生物学的液体を使って行われる。細胞もしくは組織培養物、培養ブロスのようなこの他の類似標本もまた、対象となる。あるいは、試料は、土壌、水もしくは大気のような環境資源由来、もしくは排水、水源、供給ラインもしくは製造ロットから取り出したような産業資源由来のものである。また、産業資源には、醸造のような食品醗酵工程や生物反応物由来のような醗酵培養液、もしくは肉、獲物の肉、農産物もしくは乳製品のような食物が含まれている。試験試料は、使用に先立って、血液から血漿の調製、粘性のある液体の希釈等のような前処置を施される場合がある；処置方法には、濾過、希釈、濃縮、不活性化、阻害化合物の不活性化、及び試薬の添加を含んでいる場合がある。

#### 【0072】

固体支持体に結合した分析物に相補性を有する結合部位を用いて、試料中にある関心とする分析物の多数のサブ集団を検出する方法を提供する。この方法では、各分析物とその相補的結合部位は、それぞれ特異的な結合ペアの第一及び第二メンバーからなっている。そして、多数の相補的結合部位の既知の比率の混合物



を形成し（ここで各サブ集団は相異なる相補的結合部位からなっている）、試料を混合物と接触させ、特異的結合対を固形支持体上に形成させ、試料中の対象分析物の存在に関係づけるという段階を含んでいる（Lehnenに対する）米国特許第5,567,627号。

【0073】

本発明の目的のために、標識又は検出可能な蛍光試薬は、試料中の分析物の存在に関係したシグナルを提供し、そのシグナルは、電磁波、特に紫外線、可視光の放射、もしくは阻害範囲の検出に帰着するものである。

【0074】

検定は、様々なプロトコルに従って実施される。対象の発明に従って、試料は対象の固体基質に接触させ、雑多な試薬の添加、培養、洗浄等のような様々な操作を行う。最終的な検定結果は、対象の分析物の存在もしくは量に関連する光吸収もしくは光発散による、光を吸収するかもしくは生み出す生成物の量における変化である。通常、これは、特異的結合対の相補的メンバー間における特異的結合複合体の形成の結果として現れる。その際、メンバーの一方は架橋として働きサンドイッチ状物を形成し（「サンドイッチ」検定におけるように）、もしくは一個の複合体、複数の複合体を、S. aureus プロテインA、リウマチ因子、免疫複合体に特異的な免疫グロブリン等のような複合体結合タンパク質に結合する場合がある。

【0075】

蛍光粒子、蛍光共役抗体等のような蛍光マーカーを有することによって、試料を蛍光物質によって吸収される光で照射し、光測定装置を使って発散された光を測定する。染料は、標識として用いることができ、もしくは反応、例えば酵素的触媒反応の結果として生み出される場合がある。

【0076】

同様にハイブリダイゼーションを扱う核酸分析を用いて、相補的配列が存在するかどうかを決定する不可欠な段階を遂行することができ、様々なプロトコルを用いることにより、相補的配列の存在もしくはそれがないことを示唆することになる、着色または蛍光標識、もしくは標識の生成物を提供することができる。

## 【0077】

例えば、分析を遂行する直前にアミノ酸官能基をジアゾ化することによって表面を活性化する場合、核酸試料を活性化表面に添加し、共有結合で結合させ、次に対象の配列に対し相補的な配列を有し、例えばビオチン標識を有することによって官能化されたプローブを用いる。ハイブリダイゼーションの段階が完了した後、アビジンに共役した蛍光色素（フルオロクローム）もしくは酵素を添加する。これはハイブリダイゼーションを通して表面に結合したビオチンに結合する。非特異的結合アビジンを洗い流した後、蛍光染料を直接的に測定、もしくは酵素の基質を添加し、生成物の形成を相補的配列の存在とその量の指標とする。

## 【0078】

ひとつの変形は、細胞受容体によって認識される抗原を使用するというものである。抗原は、表面に結合して細胞を捕らえ、標識した抗原は、その細胞を標識するのに用いられる。受容体は表面免疫グロブリンである。この方法で、特異的結合細胞の存在を決定することができ、それによって、そのような抗原に対し特異的な免疫グロブリンを有する表面、細胞に結合した受容体に相補的な対象抗原を決定することができる。抗原を有するにかわりに、表面に結合した抗原に対する抗体を有し、非共有結合によって抗原を表面に対し結合させる場合もある。

## 【0079】

対象となる物品は、様々な塩溶液によって複合体から放出される場合がある、血液中の血漿タンパク質、成長因子、凝固因子、抗凝固因子等のような対象の種々の生成物を単離するのに用いられる。表面に高い密度の分子を提供したいと望む場合、もしくは出来事を可視化したいと望む場合、光の迅速な伝達を提供したいと望む場合には、本発明の物品は、様々なこの他の目的に対して使用される場合があり、その際には分析物基質を固体表面に非拡散状に結合させる。

## 【0080】

## 例 1. 粒子蛍光染色の一般的な概要

水性媒体に入れたナノスフェア（300 nmポリスチレン、アミノ酸官能化済み）の1%ストックを、ピペットを使って丸底フラスコにいれる。次に、クロロホルムのような有機溶媒に入れた染料溶液（一つ以上の染料からなる）を添加す

る。懸濁液を、染料がもはやナノ球体によって吸収されなくなるまで放置する。溶媒を減圧下（真空ポンプ）で取り除く。水性媒体を染色済みナノ球体に添加し、超音波処理を施し、保存用容器に移し変える。

#### 【0081】

本発明の一つの実施態様では、ナノ粒子の一つ以上のセットを調製し、各々のセットを所定の濃度で異なる染料を使って染色する。本発明のもう一つの実施態様では、担体マイクロスフェアを一つ以上の蛍光染料を使って染色する。

#### 【0082】

単一染料ナノ粒子のセットを、望む割合で混合し、次に担体マイクロスフェアの調製物にそれらを付着もしくは共役させるのに用いる。この構築物は、本発明の物品である。得られた蛍光物品を検証し、調製物の蛍光活性／強度を決定する。ナノ粒子－微小粒子の共役体の各々のセットもしくは集団は、物品の特別なセットもしくは集団に固有な光学パターンもしくは蛍光シグナル（光学的サイン）を示している。物品の他の集団は、例えば、同数の蛍光ナノ粒子の全数量を有するが、異なる割合でそれらが混合されている。このように、たった二種類の染料を有することによって、独特の蛍光シグナルを持つ物品のセットを数多く調製することができる。他の染料を使って染色した微小粒子の調製物を有することによって、数多くの多色物品さえ得ることができる。この事は、従前の事柄を凌ぐ著しい改善である。発明者は、最初に本発明を実施に移すことができたのである。

#### 【0083】

##### 例2．二種類の染料を同時に使う染色

二種類の異なる染料を含有する、一回分溶液を調製し、同じ粒子を染色するのに用いる。染料の一つは、赤色蛍光染料、1，3－ビス〔（1，3－ジヒドロ－1，3，3－トリメチル－2H－インドール－2－イリデン）メチル〕－2，4－ジヒドロキシ－シクロブテンジイリウム、ビス（分子内塩）で、二つ目の染料は、オレンジ蛍光染料で、2－（3，5－ジメチルピロル－2－イル）－4－（3，5－ジメチル－2H－ピロル－2－イリデン）－3－ヒドロキシ－2－シクロブテン－1－オンである。染料#1のピーク放射は、585nmで、染料#2のピーク放射は630nmである。これらの染料は、それらが用いられる測定装

置であるBecton Dickinson FACScanフローサイトメーターの蛍光チャンネル二つの中央部に合うという理由で選択されている。しかしながら、他の流動細胞光度測定装置が異なる設定を有している場合があるので、蛍光チャンネルの選択は、相対的なもので、重要なものではない。

【0084】

異なる割合で混合された二種類の染料で染色された微小粒子もしくはナノ粒子の調製物を有することによって、例1で示したよりもさらに数多くの多色物品さえ得ることができる。

【0085】

例3. 粒子の異なる集団から作る多数のセットもしくは集団の調製

理論的には、そのようなセットが多様な分析に対して非常に価値のあるものであると推測されてきているが(McHugh, Methods In Cell Biology, 42, パートB (Academic Press, 1994) の“Flow Microsphere immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes”を参照されたい)、今までのところは、この分野では現実の多色ビーズの実践を行なうための変化を可能にし、それを示唆する例は知られていない。最善で、様々な割合の二種類の染料を含有するビーズの唯一及び多分最大で5集団が、可能であった。例えば、米国特許第4, 717, 655号はそのようなビーズを開示している。この開示は、そのようなビーズを調製する方法が本発明に無関係であると同時に、不可能かつ組成物の事例であった。これに対して、本発明によって真に異なる多数のサブセットを得ることが技術的に可能になった。

【0086】

相異なる蛍光特質を有するビーズのもう一つの集団を作るためには、集団における適当な増強によって、赤色／オレンジ色染料を有するナノ粒子集団の割合を変えるので、得られた割合は光学的に以前の割合と重複することがない。本発明は、光学的に異なる担体ビーズの非常に数多くのセットを、二種類の異なる染料で染色したナノ粒子の2集団の割合を変えることによって提供する。この例は、

通常の技術の一つが、この教示を用いることによって、容易により小さくて数多くのビーズのサブセットを生成することができるので、いずれにしる限定されるものではない。染色されたナノビーズのたった一つの集団だけを用い、担体粒子に対する割合を変えることもできる。当業者は、この業績に近いものでさえなにも、実際に遂行で成功を納めてきてはいないということを認識するであろう。従来の技術は、如何にその所に到達するかという通常の技術の一つを教示しなかった。

#### 【0087】

##### 例4. 蛍光染料の抗体へのカップリング

蛍光染料5(6)-カルボキシフルオレセインを、5(6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシニミド エステルを使用して、抗体と組み合わせる。N-ヒドロキシスクシニミド(2.0 mM)とジシクロヘキシルカルボジイミド(2.1 mM)を、テトラヒドロフランに溶かした5(6)-カルボキシフルオレセイン(2.0 mM)に添加して、エステルを調製する。結果得られた反応混合物を、3日間4℃の冷温中に置き、エステルを形成させる。5(6)-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシニミドエステルを、次に0.1 M NaClを含有する0.1 M NaHCO<sub>3</sub>(3 ml, Ph 8.6)に溶かした精製第一抗体、IgG(10 mg)と反応させる。結果得られたフルオレセイン標識第一抗体を、ゲル濾過のような既知の方法で精製する。

#### 【0088】

##### 例5. 分析反応物の微小粒子及び／もしくはナノ粒子へのカップリング

これ以後分析反応物と呼ばれる一連の抗体、抗原もしくは核酸プローブを、多くの従来の工程のいずれかを使ってビーズに結合する。工程は、Colvinら、“The Covalent Binding of Enzyme and immunoglobulins to Hydrophilic Microspheres” in *Microspheres; Medical and Biological Applications*, 1-13, CRC, Boca Raton, FL, 1988, Cantareroら、“The Adsorptive Characteristics of Proteins

for Polystyrene and Their Significance in Solid-Phase Immunoassays", *Anal Biochem*, 105, 375-382 (1980); 及び Illumら、"Attachment of Monoclonal Antibodies to Microspheres", *Methods in Enzymol*, 112, 67-84 (1985) 112, 67-84 (1985) に示されている。

#### 【0089】

この例では、分析物に対するウサギの抗体を微小粒子にカップリングした。抗体をリン酸緩衝塩水 (PBS)、pH 8 に透析し、その結果、280 nm での吸収による決定として濃度約 3 mg/ml を得た。抗体 6 mg を、メタノールに溶かした SPDP 1.5 mg 溶液を使って、1.5 ml SPDP (3-(2-ピリジルジチオ プロピオン酸 N-ヒドロキシスクシニミドエステル、Sigma Chemical Co.、St. Louis、Mo.) で、30 分間その誘導体を作る。その後、1M 酢酸ナトリウム、pH 4.5 を添加し、次に 1M ジチオトレイトール (DTT) を添加する。溶液を室温でさらに 30 分間攪拌し、次に SEPHADEX G-25 カラム (Pharmacia LKB Biotechnology、Inc.) に載せ、遊離 DDT を除去し、誘導体化した抗体を pH 8 カップリング緩衝液 (50 mM Tris Base、50 mM 酢酸ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA) の中に入れる。抗体調製物を微小粒子と混合し、マレイミド 100 nM あたり抗体 1 mg の割合にし、使用直前に Tris で pH 8 にする。混合物を 2 時間培養する。官能化された粒子を、30 mM MOPSO、10 mM EDTE、100 mM グルコース、0.2% アジドナトリウム、pH 6.8 で平衡にされた SEPHAROSE カラム (Pharmacia Biotechnology、Inc.) を使って、遊離抗体から分離する。Miles Pentex Fraction V BSA を添加し、最終 w/v 濃度 1% にする。酵素、アビジン、ビオチンもしくは多糖のような他のタンパク質及びアミン含有化合物は、上記等の標準的な既知の技法を用いて様々な粒子に共有結合で結合させることができる。

## 【0090】

反応物をビーズ表面へ付着させた後、各サブセットから取り出したアリコート  
を混合して、各サブセット内に既知の量のビーズを含んでいるプールを作る。プ  
ールされたセットは各サブセットから等容量のビーズで調製され、セットが各サ  
ブセットもしくは集団由来のビーズをほぼ等しい数含有するのが好ましい。この  
プールを、血清もしくは血漿のような対象の液体試料と共に培養し、ビーズ上の  
抗体と反応する液体中の抗原（分析物）の存在を検証する。培養は、一般にはビ  
ーズ表面の分析物との液体試料中分析反応物の特異的反応を促進する温度、pH  
、イオン濃度等の条件下で行なう。十分な時間の経過後、混合物中のビーズを、  
例えば抗原決定基から対象の分析物と結合する蛍光標識ヤギ抗体のような“標識  
試薬”と共にもう一期間培養する。この抗原決定基は、分析物の抗体結合断片で  
、ウサギ抗体の結合抗原決定基とは異なるものである。ウサギ抗体を捕捉してビ  
ーズに結合する第二の抗体もしくは標識試薬を、対象の分析物に結合させる。洗  
浄後（もしくは洗浄せずに）、ビーズをフローサイトメーターで処理し、四つの  
分類パラメーター前方光散乱、側方光散乱、赤色蛍光、及びオレンジ蛍光を測定  
し、各ビーズが属しているサブセットもしくは集団を同定するのに用いる。同時  
に各ビーズに行なう緑色蛍光測定（標識試薬に関連する測定パラメータ）は、ビ  
ーズに結合した抗体をビーズが持っているかどうかを決定させるものである。ビ  
ーズが属しているサブセットは、特定の抗原、例えば一連の草アレルゲン、様々  
な基質乱用薬物、一連の病原菌のような存在と相関するので、容易にそれが属し  
ているサブセットの機能としてビーズに結合した抗体の特異性を決定することが  
できる。

## 【0091】

草アレルゲンには、ブタクサ類及び様々な草の花粉抽出物（オオアワガエリ、  
ラン、June and meadow grass）が含まれている。参考材  
料として検定及び比較研究に用いる場合があるこれらの草アレルゲンの試料は、  
Greer Laboratories (Lenoir, N. C.) から入手で  
きる。乱用及び規制物質の薬物である特別例には、以下のものが含まれるが、こ  
れらに限定されない：アンフェタミン；エタンフェタミン；アモバルビタール、

セコバルビタール、ペンタバルビタール、及びバルビタールのようなバルビツレート；リブリウムとバリウムのようなベンゾジアゼピン；ハッシッシとマリファナのようなカンナビノイド；コカイン；フェンタニル；LSD；メタプアロン；ヘロイン、モルフィン、コデイン、ハイドロモリフォン、ハイドロコドンメタドン、オキシコドン、及びオピウムのようなオピエート；フェンシクリジン；プロポキシヘン等である。これらの物質は、対象の分析物、参照材料としてとして扱うことができる。

#### 【0092】

##### 例6．カルボジイミド付着

この例は、例えば抗体のような分析物を、既知のカルボジイミド化学を用いて粒子に付着させる方法を開示する。同様の方法が、担体微小粒子への特定の分析物の付着だけではなく、ナノ粒子の特定微小粒子への付着にも用いられるということに留意されたい。

#### 【0093】

モノクローナル抗体は、共有結合で外部表面にペンダント状に釣り下がったカルボキシル基を有するポリマー粒子に付着する。粒子は、スチレンーメタクリル酸共重合体（90：10分子比）からなる。ポリマー粒子の試料（乾燥重量30mg）をカルボイミドと混合し、次に抗体1.5mgを添加する。混合物を室温で回転させながら24時間培養して、付着反応を行なう。反応をウシ血清アルブミン（30mg/ml）を添加して停止し、さらに4時間培養を続ける。反応混合物を遠心分離にかけ、上澄み液を廃棄し、ペレットを一回リン酸緩衝塩水溶液（pH7.4）で洗浄し、塩水溶液で再懸濁する。各ラテックス調製物に結合した抗体量を、比較のために行なった粒子に結合したトリチウム含有ウシガンマグロブリンを有する試料の放射線のカウント数を解析することによって決定する。硫酸ドデシル界面活性剤と共に培養した後に、共有結合／全体の割合を計算する。この技法に関するさらに詳細なことは、Suttonらへの米国特許第5,397,695号に見られる例で見出すことができる。

#### 【0094】

ナノ粒子は、本質的に上記と同様に、共有結合で担体微小粒子に付着する。得



られたカップリング済み粒子を、さらにポリマー性シェルで被膜を作る（コートする）ことができる。その被膜は、例えば、粒子をモノマーのスチレン（0～80%）とジビニルベンゼン（20～100%）の中で、粒子をコーティングするのに十分な時間混合し、次に過硫酸カリウムを添加して被膜をポリマー化することによって形成される。シェル（殻）を作るもう一つの方法は、多価分子を使って、表面官能基を一緒に架橋することである。例えば、1, 1, 1-トリス（アミノエチル）プロピオニトリルが、少なくとも粒子表面上にある3つのカルボン酸官能基を覆う。殻表面を、さらにニトリル基をカルボン酸に酸化、もしくはそれをアミンに還元することによって改質を施して、各々の官能基を作る。

#### 【0095】

##### 例7. FITC標識アルブミン微小粒子の調製

担体微小粒子は、タンパク質性材を含有するポリマー材料から作ることができる。この例は、そのような粒子を蛍光で染色する方法を示す。蛍光イソチオシアネイト（FITC、Sigma Chemical Company、St. Louis、Mo.）を、共役性粒子の形成を引き起こすポリマーの存在下でヒト血清アルブミン（HAS）に接合する。遊離FITCを粒子から洗い流し、粒子をNaOHに再度溶かして、遊離FITCを含んでいないFITC標識HASを作る。

#### 【0096】

FITC（6.2  $\mu$ g）を炭酸塩緩衝液（pH10）に溶解する。溶解したFITCを、25%PVPを含有するポリマー溶液6mlとHAS（25%）1mlに入れ、0.1M酢酸ナトリウムに溶かした25%PEGを激しく攪拌しながら添加する。混合物を、室温、37℃、58℃で各30分間培養する。共役性粒子を結果として得る。混合物を14,000rpmで遠心分離にかけ、上澄み液を取り除き、粒子を脱イオン水（各10ml）で三回洗浄する。粒子を脱イオン水（10ml）に再懸濁する。再懸濁した粒子を、蛍光顕微鏡で検証する。全ての蛍光が粒子に組み込まれている。遊離している蛍光は何も観察されず、この事は、FITCの全てがアルブミンと接合し、遊離FITC分子は何も存在しないということを示している。

## 【0097】

## 例8. 付着オリゴヌクレオチドプローブを有する微小粒子の形成

第一段階で、対象のDNA配列を検出するのに適したプローブを選択する。そのプローブを、既知の方法で（例えば、上記カルボジイミドカップリングもしくはその他の方法）粒子に結合し、それにカップリングした既知のオリゴヌクレオチドを有するビーズの各アリコートを作る。オリゴヌクレオチドは、分析において特異的ハイブリダイゼーションを起こすのに十分な長さでなければならない、例えば、長さで約5～500ヌクレオチド、好ましくは約10～50ヌクレオチド、さらに好ましくは約20～30ヌクレオチドである。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドの飽和量がビーズに結合する。各ビーズに付着した配列の一部もしくは全部に相補性を有する蛍光オリゴヌクレオチドも調製する。次に、ビーズにカップリングしたオリゴヌクレオチドに相応する配列を含有する試料中のDNAの特定部位を増幅するのに用いるPCRプライマーを選択する。二本鎖（ds）もしくは一本鎖（ss）PCR技法のどちらも用いる場合がある。二本鎖生成物（dsDNA）を生み出す場合には、増幅されたPCR生成物を、既知の方法に従って、dsDNAを変性するのに十分な時間と温度で加熱して一本鎖にする。混合物を冷却し、ビーズを添加し、PCR生成物と共に、粒子上のオリゴヌクレオチドとPCR生成物との間でハイブリダイゼーションが引き起こされるに適した条件下（例えば、室温で約10分間）で培養する。ハイブリダイゼーション時間は希望する結果によって変化し、例えば24時間もしくはそれ以上の時間継続することが可能である。次に蛍光DNAプローブを添加し、混合物全部を競合ハイブリダイゼーションが起こるのに適したハイブリダイゼーション条件下で培養する。この技術に精通する人が認識しているように、使用するPCR生成物と蛍光プローブの濃度を変化させ、反応を完璧にするように調整されうる。プローブ、標的競合分子を混和する順序を変える場合があり、ここに記述したものと同じである必要はないということも認識される。

## 【0098】

一般的に、用いるPCR生成物と蛍光プローブの濃度は、分析能力を犠牲にすることなく蛍光の検出損失を最善化するように調節され、完全な相補性と一つ以上

のヌクレオチドのミスマッチを区別する。縮重プローブ分析におけるように、慎重にミスマッチを手がけることになる。模範分析では、ビーズに結合したオリゴヌクレオチドに相補性を有するPCR生成物の濃度は、用いる蛍光プローブの濃度の1～10倍である。PCR生成物がビーズ結合オリゴヌクレオチドよりも長い場合には、PCR生成物の量を増加させて、ビーズ結合オリゴヌクレオチドに相補性を有するDNAの部位における相対的な分子濃度を反映させる。好ましくは、蛍光プローブをビーズ上の相補性オリゴヌクレオチドを飽和させるに十分な量、例えば、ビーズに結合したオリゴヌクレオチドの濃度の約1～1000倍、好ましくは2～100倍、さらに好ましくは約20～50倍を添加する。

#### 【0099】

蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、参照としてここに組み込まれる米国特許第5,403,711号に示されているような既知の方法、もしくはその他の良く知られている方法で調整する場合がある。

#### 【0100】

##### 例9. 競合分子を用いる置換又は競合分析

医療研究所における多くの物質の分析は、特定のリガンドーその接続物もしくは抗原-抗体相互作用を用いる干渉をベースにしている。これらの分析では、リガンドー接続物の対の一つを発蛍光団もしくは蛍光色素で標識し、一つをビーズ上に固定する。リガンドもしくはその接続物である可溶性、非標識分析物を、反応混合物に添加し、競合的に標識成分と固定成分との相互作用を阻害する。ペアのどちらのメンバーが標識を施され、どちらが固定化されるのかということは通常重要なことではない；しかしながら、ある種の分析では、機能的有利さを考えて、分析の方向性もしくは原料を混和する順序の次第を指定する場合がある。

#### 【0101】

このタイプの例示的アッセイでは、各ビーズサブセットは抗原と共に供給される。次に、抗原-被膜ビーズは、ビーズ表面上の抗原に特異的な標識抗体と反応させる。続いて可溶性分析物（阻害剤）を含有する検査液を添加すると、標識を施された抗体は、ビーズから可溶性分析物の濃度に正比例して移動する。既知の分析物濃度の標準曲線を用いて、検査試料中の分析物の正確な定量を行なう。明

確な目的のために、標準曲線を作るのに用いた既知の濃度の分析物を、参照物質として参照する。参照物質は、通常及び本来は分析物と同一もしくは分析物分子の一部である。

#### 【0102】

P C R生成物が完全にビーズ上のオリゴヌクレオチドに相補性を有する場合、P C R生成物が完全な相補性を有しない場合に観察されるよりも高い結合親和性で競合的にハイブリダイゼーションを起こすことになる。このように、P C R生成物は、P C R生成物の相補性のレベルに多少効率的に依存して、ビーズへの蛍光相補性オリゴヌクレオチドの結合を減少させる。

#### 【0103】

##### 例10. 核酸分析

この分析に用いる核酸は、改質を施していない標本中に見出される、例えば血液細胞もしくは病原菌のような天然の核酸、もしくはそれに代ってプラスミドのクローニングやポリメラーゼ鎖反応（P C R）の結果得られた増幅核酸である。

#### 【0104】

P C Rの威力と感受性は、その中でDNAもしくはRNAオリゴヌクレオチド配列の検出が求められる広い範囲の分析問題へのその使用を見出した。P C R技法に伴う主要な困難さの一つは、最終生成物、即ち増幅DNAを測定及び分析する方法の厄介な特質である。フローサイトメトリーのビーズをベースにしたハイブリダイゼーション分析は、非常に迅速かつ正確な対象の遺伝子配列の検出を可能にする。この発明の好ましい実施形態では、対象の核酸セグメントがカップリングしているビーズを提供する。対象のP C R生成物を（もしくは、P C R工程で必ずしも得られない他のDNAまたはcDNAセグメント）、ビーズ上の核酸セグメントと、相補的蛍光DNAプローブとの間のハイブリダイゼーションを競合的に阻害するその能力によって検出する。その方法は、感受性よく正確で、P C R生成物のたった一点の変異もしくは対象のDNAの検出を行なう。マルチプレックスDNA分析方法は、特異的多型性もしくは変異を見るために、どのようなP C R生成物もしくは対象のDNAを検出するのに用いることができ、数多くの使用が、疾病の疑惑に関連する組織適合性対立遺伝子、遺伝子病に関連する変

異、自己免疫疾病、もしくは癌遺伝子の変異や新形成に関連する遺伝子、腫瘍形成の危険性の存在を映像化することができるということを当業者は認識している。上記のように命名された病状に関連するいくつかの遺伝子が、次に述べるものを含め、しかしそれに限られるものではないが、現在知られている：嚢胞性線維症遺伝子、多心内膜新形成2a型(MEN2a)、多心内膜新形成2b型(MEN2b)、多心内膜新形成I型(MENI)、ret癌原遺伝子、低濃度リポタンパク質(LDL)受容体、神経線維腫症I型(NFI)、神経線維腫症2型(NF2)、胸部及び卵巣癌感受性I型(BRCAl)、胸部及び卵巣癌感受性2型(BRCA2)、胸部及び卵巣癌感受性3型(BRCA3)、腺腫様ポリープ症大腸(APC)、アデノシンデアミナーゼ、乾皮症染料A群訂正遺伝子(XPAC)、切除修復クロス相補ゲッシ類修復欠失相補性6群(ERCC6)、脆弱X精神遅延タンパク質1(fmr1)、Duchenne筋肉ジストロフィ遺伝子、筋肉ジストロフィタンパク質キナーゼ、アンドロゲン受容体、Huntington病性遺伝子、高キサンチン-グアニンリン酸リボトランスフェラーゼ(HPR T)、アポリポタンパク質E、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ $\alpha$ 鎖(HEXA)、ステロイド21-ヒドロキシラーゼ、アンジオテンシン、ヒト結節混合リンパ球及び組織球細胞ミスマッチ修復(hNMLH1及び2)、網膜芽感受性(Rb)、形質転換性タンパク質53(p53)、ras、切断点部位/チロシントタンパク質キナーゼ(bcr/abl)、B-細胞白血病/リンパ腫2(bcl-2)イオントランスポーターをコードする遺伝子、及びそれらを組み合わせたものである。これらの遺伝子は、以下のものからなる一群から選択された疾病及び臨床的以上に関連するもの、もしくはないものである場合がある：ヒトミオトニー、パラミオトニー性先天、高ケラミン性周期性麻痺、肥大性心筋症、遺伝性橢円赤血球細胞、遺伝性球状赤血球、グルコース/ガラクターゼ吸収不良、家族性高コレステロール症、結節性硬化症、重篤な複合免疫欠失、自己免疫疾病、インシュリン依存性糖尿病、Cockayne症状、脊髄及び延髄筋肉アトロフィー、Peutz-Jegher症状、Lesh-Nyhan症状、Tay-Sachs病、アルツハイマー病、先天性副腎過形成及び高血圧、本態性高血圧、遺伝性非-ポリープ結腸癌、遺伝性結腸癌、家族性網膜芽腫、Li-Fraumeni症

状、慢性骨髄白血病、小胞及びびまん性リンパ腫、悪性リンパ腫、白血病、皮膚癌、肺癌、膵臓癌、およびそれらの組み合わせたものである。

#### 【0105】

上記に挙げた悪性疾患に加えて、以下に述べるその他のタイプの癌も入る場合がある：線維神経腫、粘液肉腫、リポ肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、骨膜腫、中皮腫、Ewing腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、杵状肉腫、結腸直腸癌腫、胸部癌、卵巣癌、前立腺癌、鱗状細胞癌腫、基底細胞癌腫アデノ癌腫、汗腺癌腫、皮脂腺癌腫、乳糖癌腫、入道アデノ癌腫、嚢胞腺癌腫、骨髄癌腫、気管支原性癌腫、腎臓細胞癌腫、ヘパトーマ、胆汁管癌腫、膜癌腫、セミノーマ、胚癌腫、Wilms腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、グリオーム、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣芽細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴覚神経腫、オリゴデンドログリオーム、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、もしくは骨髄種である。

#### 【0106】

同じように、細菌、ウイルス、菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジアのような病原性微生物もしくは原虫病原菌から取り出した、突然変異もしくは野生型（突然変異を起こしていない）核酸セグメントを同時に検出する。

#### 【0107】

##### 例11. 酵素検定

本発明は、酵素、酵素阻害物質、酵素基質、乳酸塩、ATP、グルコースのような酵素代謝生成物、及び他の関連する診断にとって重要な分析物の測定にもまた有用である。例えば、ビーズから酵素を使って切断し、その結果蛍光を減失する、選択された蛍光物質を使ってビーズサブセットを生み出す。この発明を用いて検出もしくは測定できる酵素は、以下の物を含むがこれにのみ制限されるものではない：プロテアーゼ類、ヒドロラーゼ類、オキシドレダクターゼ類、転移酵素類、リアーゼ類、リガーゼ類、シンセターゼ類、イソメラーゼ類、グリコシダーゼ類、及びヌクレオチダーゼ類である。選択された結合切断に終るような酵素は、どのようなものも測定することができる。それに代って、ビーズ結合基質

上の酵素作用は、反応混合物に存在する蛍光リガンドに対する結合ペア（リゲート）の形成もしくは同定をすることになる。改質基質を生み出すビーズは、次に新しく形成された結合ペアへの蛍光リガンドの結合によって、蛍光物質となるのである。ユニーク基質を生み出すビーズの各々の型は、区別することができるので、ビーズサブセットの混合物を、同じ反応混合物に同時に存在する複数の酵素の活性を測定するのに用いる。

### 【0108】

酵素阻害物質は、酵素反応を阻害する物質である。それらの多くは、臨床的に多く使用されている。酵素阻害物質の例には、次のものがある：塩化エドロフォニウム、N-メチルフィソスチグミン、臭化ネオスチグミン、硫酸フィソスチグミン、タクリン、マレイン酸1-ヒドロキシ、ヨードツベルシジン、P-ブプロメトラミゾール、10-( $\alpha$ -ジエチルアミノプロピオニル)-フェノチアジン、カルミダゾリウム、ヘミコリニウム-3, 3, 5-ジニトロカテコール、ジアシルグリセロールキナーゼ阻害物質I、ジアシルグリセロールキナーゼ阻害物質II、3-フェニルプロパジルアミニエ、N-モノメチル-L-アルギニン、カルビドーパ、3-ヒドロキシベンジルヒドラジン、ヒドララジン、クロルグリニン、デブレニルヒドロキシアミン、リン酸イプロニアジド、6-MeO-テトラヒドロ-9H-ピリド-インドール、ナイアラミド、パルジリン、キノクリン、セミカルバジド、トランシルプロミン、N, N-ジエチルアミノエチル-2, 2-ジフェニルバレラテ塩化水素酸、3-イソブチル-1-メチルキサテン、パバベリン、インドメタシン、2-シクロオクチル-2-ヒドロキシエチルアミン、2, 3-ジクロロ-メチルベンジルアミン (DCMB)、8, 9-ジクロロ-2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-1H-2-ベンザゼピン、酒石酸p-アミノグレートチミド、酒石酸p-アミノグルテチミド、3-インドチロシン、 $\alpha$ -メチルチロシン、L-,  $\alpha$ -メチルチロシン、L-アセトアゾルアミド、ジクロルフェンアミド、6-ヒドロキシ-2-ベンゾチアゾールスルホンアミド、及びアロプリノールである。

### 【0109】

上記の例は、非常に一般的な免疫診断用酵素、薬物、及び／又は核酸分析を例

証及び実施するのに用いられる。新薬発見に用いるコンビナトリアルケミストリーライブラリー高生産スクリーニング、汚染物質の環境スクリーニング、薬物検査、食品安全性関連研究、農業需要に用いる多数分析物検査などのようなその他の使用は、既知の標準工程に従って計画及び遂行される。

【0110】

本発明は、特別なその実施形態に関連して示されてきているが、更なる改質の可能性があるということ、この使用がこれを変えたもの、使用、もしくは次の発明の代替物の如何なる物ものもカバーするように意図されているということを理解されるであろう。一般的に、この発明の原理、及び既知もしくは在来はこの発明が関与する実施内で出てくる、もしくは上文の本質的な特徴に適用されるようなこの発明開示から得られる方針のような内容が、公にされ、添付の特許請求の範囲に従うことになる。



## 【手続補正書】

【提出日】平成12年9月29日(2000.9.29)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1つの蛍光染料により標識された所定量のナノ粒子を結合して有している担体微小粒子を含んでなる物品。

【請求項2】 担体微小粒子またはナノ粒子、若しくは担体微小粒子とナノ粒子両方がポリマーを含んでなる請求項1の物品。

【請求項3】 前記担体微小粒子が0.1  $\mu\text{m}$  ~ 1,000  $\mu\text{m}$ の直径を有するポリマー粒子を含んでなる請求項1の物品。

【請求項4】 前記担体微小粒子が少なくとも1つの蛍光染料を含んでなる請求項1の物品。

【請求項5】 前記ナノ粒子が1 nm ~ 100,000 nmの直径を有するポリマー粒子を含んでなる請求項1の物品。

【請求項6】 前記ポリマーが、50重量%以下の架橋剤を含んでなる請求項2の物品。

【請求項7】 前記ポリマーが磁石または磁気応答性の金属酸化物を含んでなる請求項2の物品。

【請求項8】 前記ポリマーがさらに官能基を含んでなる請求項2の物品。

【請求項9】 少なくとも1セットのポリマーナノ粒子であって、該1セットのポリマーナノ粒子は異なる蛍光シグナルを持っているポリマーナノ粒子を担体ポリマー微小粒子に結合させることを含んでなる蛍光物品を製造する方法。

【請求項10】 前記異なる蛍光シグナルが少なくとも1つの蛍光染料によって提供される請求項9の方法。

【請求項11】 前記蛍光染料が担体ポリマー微小粒子に組込まれる請求項

10の方法。

【請求項12】 前記ナノ粒子が前記担体微小粒子に共有結合する請求項9の方法。

【請求項13】 前記ナノ粒子のセットが前記担体微小粒子に吸着によって結合される請求項9の方法。

【請求項14】 前記蛍光物品がポリマーシェルのによって囲まれる請求項9の方法。

【請求項15】 試料内に少なくとも1つの分析物が存在するか又はしないかを決定する方法であって、

(a) 試料と、少なくとも1つの蛍光的に標識されたナノ粒子とそれぞれの分析物に結合するかそれと反応する少なくとも1つの分析反応物をその表面に配置している既知量の微小粒子とを混合して反応混合液を作製し、

(b) 分析物に反応したか結合した微小粒子を分析し、試料内に分析物が存在するかしないかを確定する、  
工程を含んでなる方法。

【請求項16】 前記混合工程(a)がさらに反応混合液中に所定量の競合分子を混合することを含んでなる請求項15の方法。

【請求項17】 前記分析工程(b)がフローサイトメトリーを用いて分析することを含んでなる請求項15の方法。

【請求項18】 前記分析物を既知量の基準物質と比較する工程(c)をさらに含んでなる請求項15の方法。

【請求項19】 分析物が抗原、抗体、レセプター、ハプテン、酵素、タンパク質、ペプチド、核酸、薬剤、ホルモン、化学物質、ポリマー、病原体、毒素、およびそれらの組合せからなる群から選択される請求項15の方法。

【請求項20】 分析反応物が分析物の結合対を含んでなる請求項15の方法。

【請求項21】 競合分子がそれぞれの分析反応物と分析物との結合を妨げる分子を含んでなる請求項16の方法。

【請求項22】 基準物質がそれぞれの分析反応物との結合において分析物

と本質的に同一である請求項18の方法。

【請求項23】 試料内の多数の分析物であり、それぞれの分析反応物によって認識される分析物を検出する方法であって、

a) 異なる蛍光シグナルと異なる分析反応物を有する蛍光物品の各集団であり、前記分析反応物は特異的に試料内の1つの分析物に結合し、各蛍光物品はそれぞれの蛍光染料で標識された少なくとも1つのナノ粒子を含んでなる、多数の蛍光物品の集団を、試料と接触させ、

b) 標識試薬へ試料を加え、

c) 分析反応物へ分析物が結合したことを示す、前記標識を検出するために前記物品を分析し、同時に

d) 前記各集団に関連した異なる蛍光シグナルの機能として、それぞれの分析物と結合する物品の集団を決定すること、  
を含んでなる方法。

【請求項24】 前記方法がフローサイトメトリーを含んでなる請求項23の方法。

【請求項25】 蛍光物品の前記集団がさらにそれらのサイズと形状によって決定される請求項23の方法。

【請求項26】 前記標識試薬が蛍光標識試薬を含んでなる請求項23の方法。

【請求項27】 対象とする多数の分析物の検出用に適したキットであって、

(a) 異なる蛍光シグナルを持つナノ粒子と結合している微小粒子の系統であり、前記系統の各構成物は対象の分析物の1つに特異的に結合することができる分析反応物を有する系統、

(b) 分析試薬と同一の分析物に結合する試薬を含んでなる第2試薬、

(c) 前記第2試薬上で、またはそれによって、または関連して提供される蛍光標識、

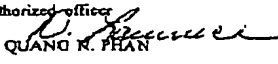
を含んでなり、前記キットが使用されるとき、分析反応物が特異的結合を介して対象の分析物と関連するようになり、第2試薬が特異的分析反応物への分析物の

結合の機能として蛍光物品に関連することが可能になり、前記蛍光標識からのシグナルが微小粒子からの蛍光シグナルとは独立したシグナル検出方法によって検出可能であるキット。

【請求項28】 分析物と分析反応物との特異的結合相互作用を妨げることができる競合分子をさらに含んでなる請求項27のキット。

【請求項29】 それぞれの分析反応物と結合する分析物と本質的に同一な基準物質をさらに含んでなる請求項27のキット。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/01315																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/566 US CL : 435/6, 7.2; 436/501 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.2; 436/501 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,326,692 A (BRINKLEY et al) 05 July 1994, see entire patent.</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 4,987,539 A (MOORE et al) 22 January 1991, see entire patent.</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,093,234 A (SCHWARTZ) 03 March 1992, see entire patent.</td> <td>27-29</td> </tr> <tr> <td>X,P — Y,P</td> <td>McHUGH, T.M. Methods in Cell Biology, 2nd Ed., Part B, Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes. 1984, Vol. 42, Chapter 33, pages 575-594, especially pages 578-562.</td> <td>1-2, 8-26 — 3-7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,326,692 A (BRINKLEY et al) 05 July 1994, see entire patent.	1-26	Y	US 4,987,539 A (MOORE et al) 22 January 1991, see entire patent.	1-26	Y	US 5,093,234 A (SCHWARTZ) 03 March 1992, see entire patent.	27-29	X,P — Y,P	McHUGH, T.M. Methods in Cell Biology, 2nd Ed., Part B, Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes. 1984, Vol. 42, Chapter 33, pages 575-594, especially pages 578-562.	1-2, 8-26 — 3-7			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 5,326,692 A (BRINKLEY et al) 05 July 1994, see entire patent.	1-26																		
Y	US 4,987,539 A (MOORE et al) 22 January 1991, see entire patent.	1-26																		
Y	US 5,093,234 A (SCHWARTZ) 03 March 1992, see entire patent.	27-29																		
X,P — Y,P	McHUGH, T.M. Methods in Cell Biology, 2nd Ed., Part B, Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes. 1984, Vol. 42, Chapter 33, pages 575-594, especially pages 578-562.	1-2, 8-26 — 3-7																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X*</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*Y*</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*C* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*A*</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*C* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A*	document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	*T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
*C* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A*	document member of the same patent family																		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 07 APRIL 1999		Date of mailing of the international search report <b>12 MAY 1999</b>																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  QUANG N. PHAN Telephone No. (703) 308-0196																		

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW